LIBRARY,
MAR 22 1900
UNIVERSITY OF TORONTO

MEDEDEELINGEN

UIT

'S LANDS PLANTENTUIN.

XXXIV.

ONDERZOEK OVER BACTERIËN

BIJ DE

FERMENTATIE DER TABAK.

DOOR

Dr. J. H. VERNHOUT.

BATAVIA
G. KOLFF & Co.
1899.

MEDEDEELINGEN

UIT

'S LANDS PLANTENTUIN.

XXXIV.

ONDERZOEK OVER BACTERIËN

BIJ DE

FERMENTATIE DER TABAK.

DOOR

Dr. J. H. VERNHOUT.

BATAVIA
G. KOLFF & Co.
1899.

In de volgende bladzijden zal men de resultaten van mijne bacteriologische onderzoekingen over fermenteerende tabak vereenigd vinden. Reeds vroeger is er in het tijdschrift Teysmannia, onder de rubriek: „Korte berichten uit 's Lands Plantentuin, uitgaande van den Directeur dier inrichting" een rapport van mijne hand verschenen, waarin een en ander over de bacteriën, die hoogst waarschijnlijk bij de fermentatie van de tabak een rol spelen, is medegedeeld. Mijn plan was om telkens, naarmate er weer nieuwe resultaten verkregen waren, daarvan op dezelfde plaats mededeeling te doen. Eerst wanneer deze een afgerond geheel zouden gevormd hebben, wat bij een dergelijk tijdroovend onderzoek niet zoo spoedig kan geschieden als niet-deskundigen meenen, zouden zij vereenigd zijn in een boekje, dat dan alles zou bevat hebben wat het bacteriologisch onderzoek, als dienstig voor de praktijk, gevonden had. Nu echter dit onderzoek, nog slechts in zijn beginstadium, moet afgebroken worden, wil ik toch het tot dusver gevondene in eene „Mededeeling" bijeenbrengen, al is niemand meer dan ik zelf overtuigd van het onvolledige er van.

In de beide eerste hoofdstukken vindt men een kort overzicht van de processen van het drogen en het fermenteeren der tabak en de veranderingen die daarbij optreden. Ik heb getracht een zoo volledig mogelijk overzicht te geven van de litteratuur die daarop betrekking heeft.

Het derde hoofdstuk behandelt het bacteriologisch onderzoek van fermenteerende tabak. Daar dit opstel in de eerste plaats voor de planters bestemd is, heb ik de methode van onderzoek uitvoerig uiteengezet. Evenals in de beide vorige hoofstukken zal men hier nu en dan het vroeger medegedeelde, soms met dezelfde woorden, terugvinden.

Hoofdstuk IV geeft een overzicht van proeven, die in het laboratorium genomen zijn, door tabak met reincultures van een der gevonden bacteriën te enten.

In het vijfde hoofdstuk vindt men een handleiding om inentingsproeven in het groot, op de ondernemingen zelve, toe te passen.

Eindelijk zijn in het laatste hoofdstuk de kenmerken van twee op fermenteerende tabak voorkomende bacteriën beschreven. Ter verduidelijking zijn hier eenige teekeningen bijgevoegd, die mede kunnen helpen om de bewuste bacteriën te herkennen.

Buitenzorg, Mei 1899.

J. H VERNHOUT.

INHOUD.

Hoofdstuk	I.	Het drogen der tabak	blz. 1.—
Hoofdstuk	II.	De fermentatie der tabak	„ 6.—
Hoofdstuk	III.	Bacteriën, die op fermenteerende tabak voorkomen.	„ 15.—
Hoofdstuk	IV.	Inentingsproeven met reincultures in het laboratorium	„ 32.—
Hoofdstuk	V.	Inentingsproeven op de ondernemingen.	„ 37.—
Hoofdstuk	VI.	Kenmerken en eigenschappen van twee op fermenteerende tabak voorkomende bacteriën	„ 40.—
Naschrift.			„ 48.—

HOOFDSTUK I.

HET DROGEN DER TABAK.

Niet minder dan voor het te veld staande gewas, wordt ook voor de afgeplukte tabaksbladen, die in de droogschuur en later in de fermenteerschuur komen, de grootste zorg vereischt. Een jarenlange ondervinding, zoowel in Europa als in tropische gewesten, is noodig geweest om den planters die methoden bij het drogen en fermenteeren te leeren, die de beste resultaten geven.

Het drogen van het tabaksblad bestaat niet alleen, zooals men al licht zou denken, hierin dat het zijn water verliest, of ten minste zijn watergehalte aanzienlijk ziet inkrimpen. Was het hierom te doen, dan zou het de eenvoudigste methode zijn, de groene tabaksbladen in een eest te brengen, en daarin bij vrij hooge temperatuur te laten tot zij volkomen droog waren. Op die wijze zou men een zeer slecht, zoo niet onbruikbaar produkt krijgen. Bij het drogen van de takak toch moet niet alleen het watergehalte verminderd worden, maar moeten tevens allerlei ontledingen en omzettingen plaats hebben in de bestanddeelen van het blad. Dit gebeurt alleen bij een langzaam drogen, zooals het in de schuren plaats vindt.

Wanneer de bladen van het veld in de droogschuren komen, leven zij nog; het drogen is eigenlijk niets anders dan een langzaam afsterven, waarbij omzettingen in de koolhydraten en eiwitstoffen plaats hebben. Om dit proces in goede richting te leiden, moet men voor voldoende toetreding van lucht zorgen om de noodige zuurstof te verschaffen, die voor de omzettingen, voornamelijk oxydatie-processen, noodig is. De bladen mogen daarom, vooral in het eerste stadium der droging, niet te dicht op elkaar hangen; er kunnen dan door gebrek aan zuurstof, reductie-processen optreden, die aanleiding geven tot rottingsverschijnselen, waardoor het blad veel aan waarde verliest, ja zelfs onbruikbaar kan worden. Men dient echter

tevens te zorgen dat er geen te sterke luchtstroom in de droogschuren is, daar hierdoor het drogen te snel zou gaan en de gewenschte omzettingen in het blad niet tot stand zouden komen. Door het openen en sluiten der in de droogschuren aangebrachte kleppen, kan voor een matigen luchtstroom gezorgd worden. In hoofdzaak kan men twee methoden van drogen onderscheiden: de bladen worden elk afzonderlijk aan touwen of stokjes geregen en opgehangen, of de geheele plant wordt afgesneden en met den basis naar boven opgehangen. Een voordeel van de laatste methode is, dat hierbij de kansen op rotting veel minder zijn, daar de bladen van zelve uit elkaar hangen en dus voldoende aan de lucht geëxponeerd zijn. Overigens hebben onderzoekingen van NESZLER aangetoond dat het op de kwaliteit van het blad geen invloed heeft, of het aan den stam vastzittend, of daarvan gescheiden, gedroogd wordt.

Het eerst verliezen de randen van de bladen een gedeelte van hun water, en sterven langzaam af. Er treden gele plekken in het blad op, die zich langzamerhand over de geheele oppervlakte uitstrekken en eindelijk in bruin overgaan. Het langst blijft de hoofdnerf in leven; deze is vaak nog groen en sappig, wanneer het geheele blad reeds een bruine kleur heeft aangenomen. Vooral bij dikke hoofdnerven verdient het daarom aanbeveling eene groote insnijding in de hoofdnerf te maken, waardoor het waterverlies sneller plaats heeft.

Zooals reeds boven opgemerkt is, hebben er gedurende het drogen omzettingen in de koolhydraten plaats. Deze hebben het onderwerp uitgemaakt van een uitvoerig onderzoek van MÜLLER-THURGAU 1). Aanleiding daartoe vond hij in een artikel van SACHS 2), die eene menigte bladeren van verschillende planten op verschillende tijden van den dag op hun zetmeelgehalte onderzocht, en tot de ontdekking kwam dat zij 's morgens geen zetmeel bevatten, 's avonds daarentegen vol daarvan zijn. Wanneer dit ook bij de tabaksbladen

---

1) H. MÜLLER-THURGAU. Ueber das Verhalten van Stärke und Zucker in reifenden und trocknenden Tabaksblättern. Landwirthsch. Jahrb. XIV Band, 1885.

2) J. SACHS. Ein Beitrag zur Kenntnisz der Ernährungsthätigkeit der Blätter. Arb. des bot. Instituts Würzburg III. 1888.

het geval was, zou nagegaan moeten worden of het zetmeelgehalte van het rijpe blad invloed had op de kwaliteit van het blad na de fermentatie, en zoo dit het geval zou blijken te zijn, zou men hierdoor eene vingerwijzing krijgen, welke tijd van den dag het meest geschikt was tot het oogsten der bladen. Müller-Thurgau vond dat de tijd van den dag, waarop geoogst wordt, geen invloed heeft op het zetmeelgehalte van de bladen. Het bleek echter uit zijne onderzoekingen dat het stadium van rijpheid, waarin het tabaksblad verkeert, wel invloed heeft op zijn gehalte aan zetmeel. Als teeken van rijpheid wordt beschouwd, dat het blad iets lichter van kleur wordt en er geelgroene vlekken optreden, die het blad een gemarmerd voorkomen geven. Zulk een rijp blad nu, bevat, op welken tijd van den dag ook geoogst, zeer veel zetmeel. Dit hooge zetmeelgehalte van rijpe bladen is niet, gelijk men wellicht zou vermoeden, het gevolg van eene sterkere assimilatie, zooals uit vergelijkende proeven met bladen die aan 't licht werden blootgesteld en andere, die in het donker werden gehouden, bleek. De reden er van, moet hierin gezocht worden, dat de omzetting van zetmeel in suiker, die bij groeiende bladeren steeds plaats vindt, bij het rijpe tabaksblad zeer langzaam gaat.

Bladen, in wier oksel men een zuiger laat staan, hebben, wanneer zij geoogst worden, een geringer zetmeelgehalte dan even rijpe bladen, bij welke de zuigers verwijderd zijn.

Bij de afgeplukte bladen wordt het zetmeel omgezet in suiker, tengevolge van de ademhaling, die in het nog levende blad voortgaat. De aanstoot tot deze dislocatie moet gelegen zijn in de wond, die ontstaat bij het afplukken of afsnijden van het blad, resp. den stam, daar bij het rijpe blad aan de nog in den bodem wortelende plant eene dergelijke omzetting der koolhydraten slechts in geringe mate plaats vindt. Stich 1) vond dat verwonding eene stijging van de ademhalingsintensiteit ten gevolge heeft, hetzij door als prikkel te werken, hetzij doordat zij, door vergrooting der absorbeerende oppervlakte, meer toevoer van zuurstof bewerkt.

---

1) C. Stich. Atmung der Pflanzen bei verminderter Sauerstoffspannung und bei Verletzungen. Flora 1891.

De suiker wordt verder ontleed in koolzuur en water, zoodat bij de gedroogde tabaksbladen slechts een gering suikergehalte gevonden wordt.

Ook de eiwitstoffen ondergaan groote veranderingen, en worden omgezet in amiden, waarbij vooral asparagine ontstaat. Müller-Thurgau meent dat de ontleding der eiwitstoffen samenhangt met die der koolhydraten, en des te vollediger is naarmate er meer koolhydraten in het blad zijn. Hij verklaart zich dus voor een hoog zetmeelgehalte der bladen bij het begin van het drogingsproces, daar hij eene zoover mogelijk gaande ontleding der eiwitstoffen gunstig acht voor de kwaliteit van de tabak. Behrens 1) die zich ook voor dit laatste verklaart, merkt daarentegen op dat het de eiwitstoffen zijn die de ademhaling onderhouden, en dat deze bij hunne ontleding amiden doen ontstaan, welke laatste wederom met de voorhanden zijnde koolhydraten tot eiwitstoffen worden opgebouwd. Hieruit volgt dat juist een gering gehalte aan koolhydraten de ontleding der eiwitstoffen zou bevorderen.

Deze kwestie is door een eenvoudige proef uit te maken. Eenige dagen voor men de bladen gaat oogsten, derhalve kort voordat zij rijp zijn, kiest men er eenige uit, en bedekt daarvan de eene bladhelft. In deze van het licht afgesloten bladhelften heeft geen assimilatie plaats en wordt dientengevolge het zetmeelgehalte geringer 2). Wanneer de bladen rijp zijn worden zij afgeplukt en in beide helften het eiwitgehalte bepaald. Door verder beide stukken der gehalveerde bladen op de gewone wijze te laten drogen en fermenteeren, kan men nagaan welke de invloed is op de kwaliteit van de tabak.

Behrens 3) constateerde de volgende veranderingen in het tabaksblad gedurende het drogen:

---

1) J. Behrens. Weitere Beiträge zur Kenntnis der Tabakpflanze X. Über die Mittel zur Hebung der Qualität des Tabaks. Landwirtsch. Versuchs-Stat. XLVI Band, 1895.

2) In verband met de hierboven medegedeelde resultaten van Müller-Thurgau, moet men natuurlijk zorgen bladen te nemen, die nog niet geheel rijp zijn.

3) J. Behrens. Weitere Beiträge etc. VI. Das Trocknen der Tabaksblätter. Landw. Versuchs-Stat. XLIII. 1893.

1. Het drooggewicht vermindert.
2. Het gehalte aan zouten van organische zuren wordt verhoogd.
3. Het gehalte aan nicotine verandert niet.
4. Het gehalte aan eiwitstoffen neemt af, dat aan amiden neemt toe.
5. De aetherische olie verdampt.
6. Het gehalte aan zwavelzure zouten neemt toe.

Mikroörganismen spelen bij het normale drogingsproces geen rol. Wel komen er schimmels en bacteriën op de drogende bladen voor, maar deze zijn òf onverschillig òf nadeelig voor de kwaliteit.

HOOFDSTUK II.

DE FERMENTATIE DER TABAK.

Wanneer de tabak voldoende gedroogd is, het blad eene bruine kleur heeft en de hoofdnerf haar water heeft verloren, is het tijdstip gekomen waarop het fermentatieproces kan beginnen. De bladen worden tot bossen bijeen gebonden, en deze tot groote stapels opgehoopt, die den vorm van reusachtige zesvlakken hebben, wier lengte, diepte en hoogte vaak meer dan 3 M. bedragen, en die duizenden ponden tabak bevatten. Onder het opstapelen der bossen worden telkens op bepaalde hoogten kokers van bamboe in den stapel geplaatst; deze dienen om op een gemakkelijke wijze thermometers in den stapel te kunnen brengen en ze er telkens uit te kunnen nemen ter controleering der temperatuur. De tabak begint zich namelijk spoedig belangrijk te verwarmen; deze verhoogde temperatuur is een kenteeken dat de fermentatie begonnen is. Daarbij treedt een eigenaardige geur op, die aan warm roggebrood doet denken, en die niets van tabakslucht heeft.

Om een goed product te krijgen, is het noodig het fermentatieproces zoo te leiden, dat geen te hooge temperatuur bereikt wordt. Voor verschillende soorten van tabak is de behandeling hierbij nog verschillend; als maximum-temperatuur, ten minste in Oost-Java, mag 60° aangenomen worden, terwijl men vaak zelfs niet hooger dan 50° gaat. Is deze temperatuur bereikt, dan wordt de stapel omgezet, waarbij gezorgd wordt dat de bossen, die boven en aan den rand van den stapel lagen, nu binnen in komen, daar zij slechts weinig of in 't geheel niet warm zijn geworden. Men herhaalt deze bewerking, totdat alle bossen van den stapel voldoende gefermenteerd hebben, wat den kundigen planter door de ervaring is geleerd. Een blik en een greep met de hand is hem voldoende om hem te toonen of de tabak al dan niet is uitgefermenteerd.

Terecht merkt BEHRENS 1) op dat men tot nog toe niets exacts, tastbaars weet wat betreft het doel, dat men met de fermentatie beoogt. Wel weet men dat voorkomen en aroma van de tabak er door veredeld worden, en zij tengevolge der fermentatie beter geschikt wordt om bewaard en verzonden te worden.

Van zelf doet zich nu de vraag voor welke de oorzaak is van de temperatuursverhooging in fermenteerende stapels tabak. Was men vroeger de meening toegedaan dat men hier uitsluitend met scheikundige processen te doen had, in den laatsten tijd is men meer geneigd aan een physiologisch proces, aan levensuitingen van mikroörganismen te denken. Dit kan geen verwondering baren, als men bedenkt welk eene belangrijke rol lagere organismen bij allerlei takken van industrie vervullen 2). Vooral waar men processen, die groote overeenkomst vertoonen met de tabaksfermentatie, zooals de zelfverhitting van hooi en katoen 3), het warm worden van hop 4), de bereiding van zuurvoeder en van bruinhooi 5), aan de werkzaamheid van microben moet toeschrijven.

Dat bij de zelfverhitting van tabak levende wezens eene rol zouden vervullen, hebben reeds voor jaren onderzoekers, die zich met de

---

1) J. BEHRENS. Die Beziehungen der Mikroorganismen zum Tabakbau und zur Tabakfabrikation. Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten II Abt. II Band. No. 16. 17. 1896.

2) J. H. VERNHOUT. De beteekenis der microben voor de industrie. Teysmannia 8ste jaargang 1897.

3) F. COHN. Ueber Wärme-Erzeugung durch Schimmelpilze und Bakterien. Vortrag gehalten auf der Wanderversammlung der Schlesischen Gesellschaft für vaterländische Kultur zu Brieg. 1890.

F. COHN. Ueber thermogene Bakterien. Berichte der Deutschen botanischen Gesellschaft. Band XI. 1893.

L. HAEPKE. Die Selbstentzündung von Schiffsladungen, Baumwolle und andern Faserstoffen, Steinkohlen, Heuhaufen, Tabak etc., sowie deren Verhütung. Bremen, 1893.

4) J. BEHRENS. Der Ursprung des Trimethylamins im Hopfen und die Selbsterhitzung desselben. Arbeiten des bacteriologischen Instituts der technischen Hochschule zu Karlsruhe, 1894.

J. BEHRENS, Studien über die Konservirung und Zusammensetzung des Hopfens. Wochenschrift für Brauerei, 1896.

5) FR. ALBERT, Die Umfrage über die Braunheuherstellung. Mitteilungen der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft, 1893/94.

studie der tabak bezighielden, min of meer vermoed. Zoo heeft HERMBSTÄDT 1) fermentatie met gisting gelijk gesteld, waaruit blijkt dat hij in de fermentatie der tabak een analoog verschijnsel zag als in de gisting van suikerhoudende vloeistoffen, waarvan toen echter nog geen juiste verklaring gegeven was.

Ook NESZLER 2) vermoedde wel dat de fermentatie een soort van gisting was, al bracht de stand der wetenschap ten tijde dat hij zijn voortreffelijk boek over de tabak schreef, mede dat hij in de fermentatie meer een uitsluitend chemisch proces zag.

Zooals hierboven reeds is opgemerkt deelt MÜLLER-THURGAU 3) in een uitvoerig opstel de resultaten mede van zijne onderzoekingen over de veranderingen die de koolhydraten ondergaan in drogende en fermenteerende tabaksbladen. Merkwaardig mag het voorzeker genoemd worden dat hij in een noot de mogelijkheid veronderstelt dat bacteriën bij die omzettingen medewerken.

FESCA 3) vergelijkt het fermenteeren der tabak in stapels met de zuurvoederbereiding. Hij heeft hier echter alleen de chemische processen op het oog, hoewel de vergelijking ook op bacteriologisch gebied recht van bestaan heeft.

De stelling dat de fermentatie der tabak werkelijk door mikroorganismen wordt veroorzaakt, is het eerst 5) uitgesproken door SUCHSLAND 6). In eene voorloopige mededeeling bericht hij dat op

---

1) S. FR HERMBSTÄDT. Gründliche Anleitung zur Kultur der Tabakspflanzen und der Fabrikation des Rauch- und Schnupftabaks nach agronomischen, technischen und chemischen Grundsätzen. Berlin 1822.

2) J. NESZLER. Der Tabak, seine Bestandteile und seine Behandlung. Mannheim 1867.

3) H. MÜLLER-THURGAU. Ueber das Verhalten von Stärke und Zucker in reifenden und trocknenden Tabaksblättern. Landwirtschaftliche Jahrbücher XIV Band. 1885.

4) M. FESCA. Ueber Kultur, Behandlung und Zusammensetzung Japanischer Tabake. Landwirthsch. Jahrb. XVII Band 1888.

5) Onlangs werd mij mondeling door den Praagschen hoogleeraar MOLISCH medegedeeld, dat voor jaren, langen tijd vóór de publicatie van SUCHSLAND, in Oostenrijk eene Commissie waarin hij zelf zitting had, werd benoemd om een bacteriologisch onderzoek van de tabak in te stellen. Dit onderzoek heeft echter geen verdere gevolgen gehad.

6) E. SUCHSLAND. Ueber Tabaksfermentation. Berichte der Deutschen botanischen Gesellschaft Band IX. 1891.

alle tabakssoorten, die hij onderzocht, bacteriën voorkwamen, in groot aantal individu's, maar in gering aantal soorten. Als materiaal voor zijn onderzoek diende tabak uit Havana, St. Domingo, Kentucky, Brazilië, Turkije, Griekenland, Rusland, de Palts, Elzas-Lotharingen, Breisgau en Uckermark. Dat de bacteriën werkelijk de veroorzakers der fermentatie zijn, leidt SUCHSLAND daaruit af, dat zij als reinculturen gekweekt en op andere soorten van tabak gebracht, daarin veranderingen in smaak en geur teweeg brengen, die overeenkomen met den smaak en den geur van de tabak, waarvan zij afkomstig waren. Hij meent dat de bacteriën, die op de tabak uit overzeesche gewesten voorkomen, betere, edelere producten uit de bestanddeelen van het tabaksblad vormen, dan die, welke op de Duitsche tabak leven. Door inlandsche tabak te laten fermenteeren met medewerking dier bacteriën, uit warme gewesten afkomstig, verkreeg SUCHSLAND verrassende uitkomsten. Over de ontledingen, die deze tabaksbacteriën tot stand brengen, en de stoffen die zij vormen, deelt hij echter niets mede. Alleen vermoedt hij dat zij de nicotine in nicotinekamfer omzetten. In twee andere publicaties 1) deelt SUCHSLAND de verdere resultaten mede, die de toepassing van zijne methode in de praktijk gehad heeft waarbij hij de medewerking van eenige groote fabrikanten ondervond. Hij heeft een patent genomen op zijne methode, patent No. 56539, en levert aan de belanghebbenden op bestelling de gewenschte „edelfermenten" 2). Onafhankelijk van SUCHSLAND, alleen door diens eerste publicatie ertoe geleid, heeft ook de firma HERMANN GIESECKE 3) proeven genomen, met Duitsche tabak te laten fermenteeren onder den

1) E. SUCHSLAND. Ueber das Wesen der Tabakfermentation und über die sich daraus ergebende Möglichkeit, den Fermentationsprocess behufs Veredelung der Tabake zu beeinflussen. Periodische Mittheilungen des Tabak-Verein Mannheim No. 38. 1892.

E. SUCHSLAND. Beobachtungen über die Selbsterwärmung des fermentierenden Tabaks. Festschrift der Latina zur zweihundertjährigen Jubelfeier der Universität Halle-Wittenberg 1894.

2) In 1895 deelde SUCHSLAND mij mede dat de industrie zich bijna niet meer van zijne methode bediende en dat hij wegens drukke bezigheden op ander gebied, voorloopig zijne bacteriologische onderzoekingen gestaakt had.

3) Ueber die Edelfermentatie des Tabaks [Patent SUCHLAND]. Mittheilung der Firma HERMANN GIESECKE.

invloed van bacteriën, die van Havana- en Braziliaansche tabak afkomstig waren. Ook nu was het resultaat zoodanig dat kenners eene belangrijke verbetering in den smaak constateerden. Door een overeenkomst met SUCHSLAND heeft die firma het recht gekregen om bacteriën voor de edelfermentatie der tabak in den handel te brengen. Het laboratorium waar dit geschiedt, staat onder leiding van A. KOCH. Evenmin als SUCHSLAND, heeft KOCH iets medegedeeld over de morphologie en biologie der mikroörganismen, die hij gekweekt heeft en over de veranderingen, die zij in de tabak teweeg brengen.

HANAUSEK 1) vestigt er de aandacht op dat het op Cuba bestaand gebruik 2) om de tabak te veredelen, overeenkomst heeft met de de door SUCHSLAND en KOCH voorgeschreven behandeling met reincultures van bacteriën. De gefermenteerde tabak wordt daar n.l. besprenkeld met een aftreksel van beschadigde bladen, die echter van uitstekende kwaliteit moeten zijn.

Hetgeen tot nu toe bekend is over de microben, welke op fermenteerende tabak voorkomen, is het volgende:

Volgens BEHRENS 3) komt vrij algemeen op de nerven van gefermenteerde tabak de schimmel *Aspergillus fumigatus* voor, die bij hooge temperaturen zeer goed groeit. Daar de kiemen van deze schimmel bijna overal in de lucht verbreid zijn, behoeft het ons niet te verwonderen haar in de fermenteerende tabaksstapels te vinden. Bij de fermentatie speelt deze *Aspergillus* geen rol. Ditzelfde is het geval met twee bacteriën, die BEHRENS 4) op ongefermenteerde tabak vond, den hooibacil (*Bacillus subtilis*) en een *Clostridium*-soort.

DÁVALOS 5) geeft in een vrij uitvoerig opstel eene beschrijving

---

1) T. F. HANAUSEK. Zur künstlichen Veredelung gewöhnlicher Tabakssorten. Zeitschrift für Nahrungsmitteluntersuchung und Hygiene. 1891.

2) Dit wordt medegedeeld door SEMLER. Tropische Agrikultur, Band III. Ook DÁVALOS vermeldt dit gebruik in zijn hieronder geciteerd opstel.

3) J. BEHRENS. Ueber ein bemerkenswertes Vorkommen und die Perithecien des Aspergillus fumigatus. Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde XI Band. 1892.

4) J. BEHRENS. Weitere Beiträge zur Kenntnis der Tabakpflanze VII. Die Fermentation. Die landwirtschaftlichen Versuchs-Stationen. Band XLIII. 1893.

5) J. N. DÁVALOS. Notas sobre la fermentación del tabaco. Crónica Médico-Quirúrgica de la Habana, Tomo XVIII. 1892.

ving der mikroörganismen, die hij op Havana-tabak vond. Het zijn een *Saccharomyceet* (gistzwam) en vier bacteriesoorten, die hij *Bacillus* A, B, C en E noemt. De eerste noemen de tabakshandelaars op Cuba „schimmel van de tabak". Zij ontwikkelt zich snel wanneer de tabak vochtig en van de lucht afgesloten wordt gehouden. Waarschijnlijk is deze microbe dezelfde die BEHRENS 1) op gefermenteerde tabak heeft aangetroffen, en die in Duitschland geregeld op de bladen voorkomt, die na afgeloopen fermentatie, op kleine stapels gezet worden. Zij vormt, vooral op de nerven, een wit zoutachtig laagje. Vermoedelijk is dit verschijnsel hetzelfde als hetgeen in Oost-Java salpeter op de tabak genoemd wordt; ik vond ten minste dat die „salpeter" uit organismen bestond, die groote overeenkomst met *Saccharomyceten* hadden.

BEHRENS onderzocht de physiologische eigenschappen van de microbe, en vond dat zij in suikeroplossingen eene langzaam verloopende alcoholische gisting te weeg brengt. Ook heeft zij het vermogen zetmeel in suiker om te zetten.

Hare eigenschappen wijzen haar, volgens BEHRENS, eene plaats in het systeem aan in de nabijheid van *Monilia candida*.

In het genoemde witte laagje op de nerven vond BEHRENS, behalve deze *Monilia*, ook nog eene andere gistzwam, eene *Torula*-soort. Deze brengt geene gisting tot stand, en vormt op kunstmatige voedingsbodems eene rose kleur.

Van de vier door hem geïsoleerde bacteriën geeft DÁVALOS eene beschrijving, zonder in te gaan op de mogelijke rol die zij bij de fermentatie spelen.

Terwijl het hier medegedeelde meer speciaal betrekking heeft op tabak, die voor rooken bestemd is, wil ik ook een enkel woord zeggen over de gistingen, die snuiftabak nog ondergaat, en de daarbij gevonden mikroörganismen. De reeds gefermenteerde tabak wordt fijn gesneden of in poedervorm gebracht, welke methode vooral bij de Fransche regie gevolgd wordt voor de bereiding van snuiftabak, of wel zij wordt gekarroteerd, d.i. de bladen worden met op ver-

1) J. BEHRENS, Weitere Beiträge zur Kenntnis der Tabakpflanze IX. Ueber Mikroorganismen des Tabaks nach der Ernte. Die landwirtsch. Vers-Stat. Band XLVI. 1895.

schillende wijze samengestelde sausen besproeid en in linnen doeken vast tezamen gerold. Bij beide methoden ondergaat de tabak nog eene fermentatie.

Bij de eerste methode stijgt de temperateur veel hooger dan bij de boven vermelde fermentatie, die alle tabak ondergaat. Uitvoerige onderzoekingen zijn door SCHLOESING 1) ingesteld, die ten doel hadden na te gaan of de fermentatie een zuiver chemisch proces is, dan wel of mikroörganismen daarbij werkzaam zijn. Hij komt tot het resultaat dat de fermentatie der snuiftabak bij de gewone temperatuur begint onder den invloed van mikroörganismen, maar dat te beginnen bij eene zekere temperatuur, boven 40°, en onder 70°, zij slechts een zuiver chemisch proces is, waaraan levende wezens geen deel hebben. De rol der mikroörganismen zou zich, volgens SCHLOESING, hiertoe bepalen, dat door hunne levensfuncties de temperatuur op eene bepaalde hoogte werd gebracht, die noodig is om de gewenschte chemische en physische veranderingen in de tabak tot stand te brengen.

SCHLOESING concludeert verder uit het gehalte der lucht in de fermenteerende stapels aan zuurstof en koolzuur, en uit den invloed van het omzetten der stapels op de koolzuurproductie, dat de bij de fermentatie werkzame mikroörganismen facultatief anaëroob zijn, d. w. z. zoowel zonder als met vrije zuurstof kunnen leven.

In de fermenteerende snuiftabak vond SCHLOESING steeds in groot aantal aanwezig een *Bacillus* en een *Diplococcus*, wier optimum van groei bij 35° gelegen is. Welke rol zij bij de fermentatie vervullen, heeft hij niet onderzocht.

Over de gistingen die in de karotten plaats vinden, is nog niets bekend. Daar suikerhoudende vloeistoffen, zooals vruchtensappen, stroop, honig vaak bestanddeelen zijn der sausen, waarmede de tabak wordt besproeid, is het zeer waarschijnlijk dat er eene alcoholische gisting plaats vindt. BEHRENS 2) vond in een karot, als eenig organisme dat alcoholgisting kon veroorzaken, eene zwam, *Mucor racemosus*.

1) TH. SCHLOESING. Sur la fermentation en masses du tabac pour poudre. Mémorial des manufactures de 'l état. Tabacs. Tome I. 1884—1888.

TH. SCHLOESING. Sur la fermentation etc. [suite]. Idem. Tome II. 1889—1892.

TH. SCHLOESING Contribution à l'étude de la fermentation du râpé. Idem. Tome II. 1889—1892.

2) J. BEHRENS. Ueber Mikroorganismen des Tabaks etc.

Terwijl hetgeen in de vorige bladzijden is medegedeeld, tot voor korten tijd alles was, wat er over het aandeel dat mikroörganismen aan de gisting der tabak hebben, bekend was, is er voor een paar jaren eene publicatie van Koning 1) verschenen, die vooral daarom belangrijk is, wijl Koning niet alleen de organismen beschrijft die hij in fermenteerende tabak heeft gevonden, maar ook den invloed, dien zij op de tabak hebben, heeft nagegaan. Hij vond in gistende tabak bijna steeds *Bacillus subtilis* en *Bacillus mycoïdes*, beide in de natuur zeer verbreide bacteriën.

Verder beschrijft hij vijf bacteriën, die hij in de gistende tabak algemeen aantrof, en die hij voorloopig *Bacillus Tabaci* I, II, III, IV en V noemt. Van deze zijn de beide eerste aëroob, de drie laatste facultatief anaëroob. *Bacillus Tabaci* III vervult de hoofdrol bij de gisting. Koning stelt zich het verloop der gisting aldus voor: „*Bacillus mycoïdes*, *B. subtilis*, *B. Tabaci* I en II verbruiken de zuurstof uit den stapel met de facultatieve anaëroben *B. Tabaci* III, IV en V. Door hun levensprocessen wordt de temperatuur opgevoerd tot zelfs 60° C. en wellicht nog hooger. Gedurende een kort verloop ontstaat er plaatselijk ammonia en waarschijnlijk koolzuur, ofschoon ik dit laatste noch in den gistenden stapel, noch in de omringende lucht (hooger dan het koolzuurgehalte der buitenlucht), noch in de V-vormige gistingsbuizen kon aantoonen. Het ontstaan van ammoniak is gebonden aan de aanwezigheid van de *B. mycoïdes*, *B. Tabaci* I en II. Eerst nadat zij hun functies verricht hebben, treden de ware thermophilen: de *B. Tabaci* III, IV en V op waarvan *B. Tabaci* III de hoofdfunctie vervult".

Eindelijk heeft Koning tabak gesteriliseerd, d. w. z. alle daarop aanwezige levende wezens gedood, en die geënt met cultures van de verschillende tabaksbacteriën. Na verloop van zes weken werd de gisting gestuit en de tabak onderworpen aan het oordeel van ervaren handelaars en planters. Bijna algemeen werd de met *Bacillus Tabaci* III geënte als de beste aangewezen.

Onlangs verscheen een vervolg op deze onderzoekingen van

1) C. J. Koning. De gisting onzer inlandsche tabak. Tijdschrift voor toegepaste scheikunde en hygiene, Deel I 1897. Vergelijk ook:
C. J. Koning, Hollandsche tabak De Natuur 1897.

Koning 1). Hierin wordt medegedeeld dat hij, behalve de vijf genoemde bacteriën, nog een zesde soort, en wel een *Diplococcus* uit fermenteerende tabak isoleerde. Deze heeft zijn optimum-temperatuur bij 24°. Bij strijging der temperatuur in de gistende stapels geraken de *Diplococci* op den achtergrond. Waarschijnlijk hebben deze dus alleen beteekenis voor de fermentatie, telkens kort nadat een stapel is omgezet, en de temperatuur nog betrekkelijk laag is. Verschillende soorten tabak werden door Koning geënt met zijn *Bacillus Tabaci* I, *B. Tabaci* III, en *Diplococcus Tabaci*, en wel zoo dat hij mengsels van de reincultures dier bacteriën nam. Dezelfde soorten tabak, niet geënt, werden na afloop der fermentatie met de geënte vergeleken. De tabak bleek door de enting verbeterd te zijn. *B. Tabaci* I zou de reuk, *Diplococcus Tabaci* de brandbaarheid verbeterd hebben.

Voor ik er toe overga de door mij verkregen resultaten mede te deelen, wil ik volledigheidshalve er op wijzen dat door Behrens 2) de volgende veranderingen gedurende het fermentatieproces zijn geconstateerd:

1. Vermindering van gewicht, waardoor het stikstofgehalte schijnbaar grooter wordt.

2. Dit verlies aan substantie betreft voornamelijk de oplosbare koolhydraten en de organische zuren.

3. Een gedeelte van de nicotine verdwijnt.

4. Salpeterzuur verdwijnt geheel.

5 Asparagine werd niet meer gevonden, daarentegen werd een niet nader bepaald amidozuur aangetroffen.

6. De door aether extraheerbare stoffen verminderen.

7. Een vluchtig zuur, waarschijnlijk boterzuur, wordt gevormd.

Het voorgaande kort resumeerende, hebben wij dus geconstateerd dat er

1. Gedurende het drogen en het fermenteeren belangrijke chemische veranderingen en omzettingen in de bestanddeelen van het tabaksblad tot stand komen.

2. Dat die veranderingen gedurende het drogen voornamelijk levensfuncties van het blad zijn.

3. Dat daarentegen bij de fermentatie aan de medewerking van mikroörganismen moet gedacht worden.

1) C. J. Koning, Hollandsche tabak II. De Natuur 1898.
2) J. Behrens, Weitere Beiträge etc. VII. l.c.

HOOFDSTUK III.

BACTERIËN, DIE OP FERMENTEERENDE TABAK VOORKOMEN.

Bij mijn onderzoek over de fermentatie der tabak werd ik door den volgenden gedachtengang geleid. Wanneer werkelijk bacteriën of om meer in 't algemeen te spreken mikroörganismen een werkzaam aandeel hebben aan de veranderingen, die de bestanddeelen van het blad gedurende het fermentatieproces ondergaan, dan mogen wij verwachten dat op de bladen, die uitgefermenteerd zijn en geschikt om in balen verpakt en verzonden te worden, zich nog eenige van die microben of in elk geval sporen bevinden. Ook is de mogelijkheid niet uitgesloten dat, wanneer gedurende de achtereenvolgende stadiën der fermentatie verschillende soorten van microben werkzaam zijn, er ook van al die soorten nog sporen op het blad aanwezig zijn. Van die veronderstelling uitgaande, zou men dan op een uitgefermenteerd blad de geheele microben-flora, die bij de fermentatie eene rol vervult, vertegenwoordigd vinden.

De onderzoekingen van Koning geven aanleiding om werkelijk aan te nemen, dat er bij de verschillende phasen, die de fermentatie doorloopt, ook verschillende soorten van bacteriën het meest werkzame aandeel hebben.

De vergelijking van de verschillende aldus gevonden microben met die, welke op bladeren, uit de verschillende stadia der fermentatie afkomstig, in overwegend aantal voorkomen, zou dan aanwijzingen kunnen geven over de beteekenis van elke microbe-soort afzonderlijk gedurende den loop van het proces.

In de eerste plaats was het dus noodig een aanzienlijk getal gefermenteerde tabaksbladen te onderzoeken, en na te gaan 1° of er op één blad verschillende soorten van microben aanwezig zijn en 2° of bladen van verschillende herkomst ook een constant ver-

schil in hunne microben-flora vertoonen. Dat de microben waarschijnlijk in den toestand van sporen aanwezig waren op het vrij droge materiaal, dat mij bij mijn onderzoek ten dienste stond, deed niets ter zake, daar sporen onder gunstige omstandigheden gebracht, zooals een op bepaalde wijze samengestelden voedingsbodem en zekere graden van temperatuur en vocht, weer tot de oorspronkelijke vormen uitkiemen.

Vervolgens zouden op dezelfde wijze bladen die nog niet gefermenteerd hebben, en bladen, die korteren en langeren tijd in de stapels gebroeid hebben, moeten worden onderzocht. Met de gevonden bacteriën zouden dan inentingsproeven op gesteriliseerde, zoowel gefermenteerde als ongefermenteerde tabak moeten genomen worden om na te kunnen gaan welken invloed zij daarop uitoefenen. Blijkt het dat de gesteriliseerde en vervolgens met een reincultuur van een of meer bacteriesoorten geënte bladen alle eigenschappen krijgen, die van een goed gefermenteerd blad verlangd worden, terwijl in een contrôleproef, die geheel onder dezelfde omstandigheden is genomen, maar waarbij de gesteriliseerde tabak niet met bacteriën is geënt, de tabak blijft, zooals zij voor de proef was, dan weten wij met zekerheid dat de goede kwaliteit van de tabak werkelijk aan de bewuste bacteriën is te danken.

Is eenmaal uitgemaakt dat een of meer bacteriesoorten een gunstigen invloed hebben op den gang der fermentatie, dan eerst kunnen proeven in het groot genomen worden door een stapel tabak met reincultures te enten. Vooral in die gevallen, waar er in de stapels weinig broei zit, zooals men het uitdrukt, zou dit zeer waarschijnlijk een gunstig gevolg hebben. Men zou dan niet meer afhankelijk zijn van de toevallig op de bladen voorkomende bacteriën, maar door toevoeging van reincultures der „tabaksbacteriën", de fermentatie in eene goede richting kunnen leiden.

Het materiaal, dat ik voor mijn onderzoek gebruikte, bestond uit bossen uitgefermenteerde tabak van den oogst 1896, bossen van verschillende stadia der fermentatie afkomstig van den oogst 1897, en bossen alleen gedroogde, nog niet gefermenteerde tabak van den oogst 1898.

Hoewel er tijdens de behandeling, die de tabak in de fermen-

teerschuur ondergaat, ruimschoots gelegenheid is voor de bladen om geïnfecteerd te worden met allerlei microben, afkomstig uit de lucht, van den vloer der schuur, van de handen en kleederen der sorteerende vrouwen enz., mag men toch verwachten dat bij het onderzoek van een groot aantal bladeren zich deze toevallige gasten zullen laten scheiden van de eigenlijke tabaksmicroben. Bovendien geeft de hooge temperatuur, waarbij de stapels fermenteeren, en die zeker gunstig is voor de daarbij betrokken microben, een middel aan de hand om de levensvoorwaarden voor deze laatste zoo gunstig mogelijk te maken, wanneer men ze kunstmatig wil kweeken.

Om nieuwe infectie met vreemde kiemen zooveel mogelijk tegen te gaan, nam ik de volgende voorzorgen. Bij voorkeur koos ik uit een bos tabak de binnenste bladen, en die welke het meest in elkaar gevouwen waren. Hiervan nam ik met een gesteriliseerde schaar en pincet 1) een gedeelte af, en knipte dit op eene eveneens gesteriliseerde glasplaat in kleine stukjes. Met een gesteriliseerd pincet bracht ik deze in een kolfje gedestilleerd water, dat volkomen kiemvrij gemaakt was. Dit geschiedt aldus: nadat het kolfje schoon is gemaakt, wordt het half met gedestilleerd water gevuld en met eene watteprop gesloten. Deze prop van vetvrije watten dient als filter voor de lucht, daar zij de eigenschap bezit bacteriën niet door te laten, en alleen aan reine lucht den toegang tot het inwendige van het kolfje geeft. Om het kolfje met zijn inhoud en de watteprop te steriliseeren kan men twee methoden gebruiken, die beide ten doel hebben vochtige warmte daarop te laten inwerken, die veel sneller doodt dan droge hitte van dezelfde temperatuur 2). Men heeft nu de keus het kolfje bloot te stellen aan stroomenden waterdamp, of aan stoom van hooge spanning. Het eerste geschiedt in het apparaat van Koch, een met vilt bekleeden blikken cylinder met deksel, waarin eene kleine opening is. Onder in den

1) Deze instrumenten worden het snelst volkomen vrij van alle daaraan vastgehechte levende organismen gemaakt, door ze eenigen tijd in de vlam van een Bunsen-brander of bij gebrek aan gas, van een spiritus lamp te houden. Tegen de hier ontwikkelde hitte zijn zelfs de sporen der microben, die den grootsten weerstand tegen nadeelige invloeden hebben, niet bestand.

2) Zoo kunnen b. v. de sporen van de miltvuurbacterie een droge hitte van 120° verdragen, maar worden zij in kokend water in enkele minuten gedood.

cylinder wordt water gedaan dat aan de kook wordt gebracht. Op een rooster, boven de oppervlakte van het water, worden de voorwerpen, die gesteriliseerd moeten worden, geplaatst, zoodat zij voortdurend door den waterdamp omspoeld worden. Wil men volkomen zeker zijn dat alle levende wezens gedood worden, dan moet men den stroomenden damp minstens 6 uren laten inwerken, daar GLOBIG 1) heeft waargenomen dat er sporen van bacterien zijn, die bij kortere inwerking van waterdamp van 100° niet worden gedood.

Veel korter is de tijd, noodig om alle kiemen te dooden, indien men gebruik maakt van stoom van hooge spanning. Hiervoor is een Papiniaansche pot of autoclaaf noodig, een metalen cylinder met hermetisch sluitend deksel. Evenals bij het apparaat van KOCH worden ook hier de te steriliseeren voorwerpen op een rooster geplaatst, en wordt in het onderste gedeelte van den cylinder water gegoten. Door het water sterk te verwarmen, krijgt men spoedig binnen in den cylinder eene groote spanning, die door een manometer wordt aangegeven. Door proeven is aangetoond dat binnen een half uur vloeistoffen van ongeveer 50 ccm. volumen volkomen gesteriliseerd worden, wanneer de waterdamp een temperatuur heeft van 120° overeenkomend met één atmosfeer overdruk.

Ik gebruikte steeds de laatste methode en stelde de kolfjes gedurende 45 minuten aan gespannen waterdamp van 120° bloot, zoodat ik gerust mocht aannemen dat alle leven in het kolfje, in het water en op de watteprop vernietigd was.

Het in stukjes geknipte tabaksblad komt dus in een vloeistof, die geen kiemen bevat. Alle kiemen die later in het kolfje worden aangetroffen, moeten van het tabaksblad komen, mits men zorg drage dat alle infectie van buiten uitgesloten zij. Daartoe moet men telkens wanneer men de prop van het kolfje neemt, haar bovenste gedeelte even in de vlam houden en ook den hals van het kolfje door de vlam halen om te verhinderen dat er door den luchtstroom bacteriën naar binnen kunnen sluipen.

Dat ik het tabaksblad in water breng om het op zijn bacteriën te onderzoeken, vindt hierin zijne verklaring dat het blad als zoo-

---

1) GLOBIG. Ueber einen Kartoffel-Bacillus mit ungewöhnlich widerstandsfähigen Sporen. Zeitschrift für Hygiene, III Band. 1888.

danig natuurlijk niet onder het mikroskoop kan bezichtigd worden. Om bacteriën te zien is het noodig ze in een doorschijnende vloeistof onder het mikroskoop te brengen. Tevens is het gewenscht voor de verdere manipulaties, om de bacteriën of hunne sporen van het blad te isoleeren wat het eenvoudigst geschiedt door het blad in gesteriliseerd water te brengen.

Daar de temperatuur van een fermenteerenden stapel tot 50° en hooger klimt, mag men verwachten dat de microben die bij de gisting werkzaam zijn bij die hooge temperaturen niet alleen *kunnen* leven, maar daarin zelfs eene *gunstige* voorwaarde voor hun bestaan vinden.

Nog niet zeer lang geleden meende men dat 40° de grens was, waarboven geen groei van bacteriën meer kon plaats hebben. Gedurende het laatste tiental jaren hebben echter verschillende onderzoekingen het bestaan van bateriën, die facultatief of uitsluitend bij temperaturen boven 50° leven, aan het licht gebracht Men geeft hen den naam van thermophile bacteriën.

Zoo ontdekte MIQUEL 1) in het water van de Seine en van riolen een bacterie die een temperatuur van 60° tot 70° zeer goed kan verdragen. VAN TIEGHEM 2) vond bacteriën, die zich nog bij 74° ontwikkelden, CERTES en GARRIGON 3) troffen in de warme bronnen van Luchon bij een temperatuur van 64° bacteriën aan.

Deze gevallen konden echter als uitzonderingen, als een soort curiositeit worden aangezien, totdat een onderzoek van GLOBIG 4) aantoonde dat in de bovenste lagen van de aardkorst veelvuldig kiemen van bacteriën voorkomen, die zich bij temperaturen van 50° tot 70° kunnen ontwikkelen. Hij onderzocht monsters uit verschillende deelen der aarde afkomstig, en vond in alle thermophile bacteriën.

1) P. MIQUEL. Monographie d'un bacille vivant au delà de 70° centigrades. Annales de Micrographie. 1888. Reeds in 1879 werd die bacterie door hem ontdekt.

2) PH. VAN TIEGHEM, Sur des Bactériacées vivant à la température de 74° centigr. Bulletin de la Société botanique de France, Tome XXVIII, 1881.

3) A. CERTES ET CARRIGON. De la présence constante de micro-organismes dans les eaux de Luchon recueillies au griffon à la température de 64° et de leur action sur la production de la barégine. Comptes rendus des séances hebdomadaires de l'Académie des sciences. TOME CIII. 1886.

4) GLOBIG. Ueber Bacterien-Wachsthum bei 50 bis 70°. Zeitschrift für Hygiene. III Band. 1888.

Naar aanleiding van eene mededeeling dat in Augsburg plantenkassen verwarmd werden met afval van katoen „Nissel" genaamd, wijdde COHN 1) zijn aandacht aan dit verschijnsel. Bij proeven, die hij nam, vond hij als oorzaak der temperatuurstijging bacteriën, en wel micrococcen. Als maximum van temperatuur nam hij 67,2° waar.

MCFADYEN en BLAXALL 2), die eveneens onderzoekingen over thermophile bacteriën instelden, kwamen tot het resultaat dat deze organismen zeer verspreid in de natuur voorkomen. Zij vonden hen in water, in den grond, zelfs op aanzienlijke diepte, in de lucht, in rivierslijk, in stroo, en in de uitwerpselen van den mensch, de muis en de kip. Hun optimum-temperatuur is 60° à 65°, terwijl zij niet meer groeien bij 37°.

KARLINSKY 3) vond in de heete zwavelbronnen van Iliduze twee bacteriesoorten, die zich eerst bij een temperatuur boven 50° ontwikkelen.

LYDIA RABINOWITSJ 4), die zich ook met deze merkwaardige groep van bacteriën heeft bezig gehouden, isoleerde uit aardmonsters en uit de uitwerpselen van verschillende diersoorten acht soorten van bacteriën, wier optimum-temperatuur tusschen 60° en 70° ligt, maar die ook bij veel lagere temperaturen, zelfs bij 33° konden groeien.

SCHILLINGER 5) isoleerde eveneens uit aarde vier soorten van thermophile bacteriën, die bij 66° gisting met rijkelijke gasontwikkeling in melk en suikerbouillon teweeg brachten.

Eindelijk beschrijft TSIKLINSKY 6) twee soorten van Actinomyces, die zich bij een temperatuur tusschen 48° en 68° gelegen ontwik-

---

1) F. COHN. Ueber thermogene Bakterien Ber. der Deutschen Bot Ges. XI. 1893

2) ALLAN MACFADYEN and FRANK R. BLAXALL. Thermophilic Bacteria. The Journal of Pathology and Bacteriology, Volume III, 1894.

3) J. KARLINSKY. Zur Kenntniss der Bacterien der Thermalquellen, in: Hygienische Rundschau 1895.

4) LYDIA RABINOWITSJ. Ueber die themophilen Bakterien, in: Zeitschrift für Hygiene XX Band, 1895.

5) A SCHILLINGER. Ueber thermophile Bakterien. Hijgien. Rundschau 1898.

6) TSIKLINSKY. Sur les microbes thermophiles. Annales de Micrographie. Tome X, 1898.

kelden. Hij vond die in aarde en mest. Verder vond hij in tuinaarde een Mucedinee, die zich eerst bij temperaturen van 48° à 65° liet kweeken, terwijl de meeste schimmels hun optimum van groei bij 20° à 37° hebben.

Waar wij dus aan den eenen kant gegeven hebben het bestaan en het veelvuldig in de natuur voorkomen van bacteriën, die uitsluitend of bij voorkeur bij temperaturen van 50° en hooger groeien, en aan den anderen kant het plaats vinden van fermentatie processen, waarbij eene aanzienlijke temperatuursverhooging optreedt, daar is de onderstelling niet te gewaagd dat deze beide verschijnselen in nauw verband met elkaar staan. Het komt mij zeer waarschijnlijk voor dat bij de fermentatie der tabak *thermophile* microben een werkzaam aandeel hebben.

Om te onderzoeken of er organismen, die tot die groep behooren, op de tabak voorkomen, moeten wij de voorwaarden voor hun groei zoo gunstig mogelijk maken. Daar de fermenteerende tabak meest altijd een temperatuur boven 50° bereikt, en wanneer men het niet belette nog vaak een hoogere temperatuur zou aannemen, wilde ik in de eerste plaats onderzoeken of microben op mijn tabaksmateriaal voorkomen, die bij een temperatuur van 50° niet alleen kunnen leven, maar zelfs het snelst groeien.

Daartoe zette ik het kolfje met het in stukjes geknipte tabaksblad in een stoof met dubbelen wand, welke laatste met water gevuld werd. Door een gasvlam wordt dit water verwarmd en op een bepaalde temperatuur gebracht, waardoor het inwendige van de stoof den invloed der omringende temperatuurschommelingen niet ondervindt. De vlam wordt zoo geregeld dat de temperatuur van het water en dus ook die van het inwendige der stoof constant bleef, en wel voor het laatste 50° bedraagt. De op het blad aanwezige sporen van thermophile microben zullen in die voor de microben gunstige temperatuur wellicht ontkiemen, en de aldus ontstaande microben zich in het water verspreiden. De sporen van andere microben daarentegen, die zulk een hooge temperatuur niet kunnen verdragen, zullen in dien toestand blijven.

Nadat het kolfje gedurende 24 uren in de stoof bij 50° had gestaan, nam ik het er uit. Het water is bruin gekleurd door kleur-

stoffen in het blad die daarin zijn opgelost, de geur is niet onaangenaam 1). Een druppel, onder het mikroskoop gebracht, geeft eene menigte bacteriën en sporen te zien. Daar dezelfde bacteriënsoort zich dikwijls onder verschillende gedaanten voordoet, en verschillende bacteriesoorten vaak hetzelfde voorkomen hebben, daar bovendien de sporen geen gevolgtrekkingen omtrent de bacteriën, waartoe zij behooren, toelaten, is het noodig om deze laatste (de sporen) te laten ontkiemen, en de oogenschijnlijk verschillende bacteriën ieder afzonderlijk in een druppel water of andere vloeistof te brengen. Door dan van iedere bacterie de morphologische en physiologische eigenschappen na te gaan, kan men te weten komen met hoeveel verschillende soorten men te doen heeft. Dat dit een zeer tijdroovend en omslachtig werk is behoeft geen betoog. Toch heeft men zich langen tijd op zulk eene wijze moeten behelpen om uit een mengsel van verschillende bacteriën, iedere soort afzonderlijk te verkrijgen, en nog bedient de Fransche school van bacteriologen uit piëteit voor Pasteur, zich wel van deze methode.

Men gaat dan als volgt te werk: men brengt een druppel van de vloeistof, wier bacteriën men wil onderzoeken in eene zoogenaamde telkamer onder het mikroskoop. Met behulp van dit apparaat is het mogelijk om het aantal bacteriën te tellen dat in 0.00025 cmm. aanwezig is. Wanneer wij dit = M stellen, dan bevat één cmm. 4000 M. bacteriën. Vervolgens verdunnen wij een gedeelte van de vloeistof zoo sterk met gesteriliseerd water, dat volgens berekening op elke twee druppels (van een bepaald volumen) ééne bacterie komt. Uit deze verdunde vloeistof brengen we eindelijk telkens één druppel in een reeks van kolfjes, die gedeeltelijk gevuld zijn met een gesteriliseerde voedingsvloeistof. Theoretisch moet er nu in de helft van het aantal kolfjes ééne bacterie zijn gekomen, die zich nu verder zal ontwikkelen en het aanzijn geven aan eene reincultuur. In de praktijk komt het echter voor dat toch nog twee bacteriën, tot eene verschillende soort behoorende, in één kolfje

1) Bij kolfjes, die op dezelfde wijze waren behandeld, doch bij kamertemperatuur [25° à 28°] waren blijven staan, trad somtijds spoedig een onaangename geur op, die zijn ontstaan aan rottingsbacteriën te danken heeft. Deze komen bij de hooge temperatuur niet tot ontwikkeling.

terecht komen Volkomen zeker is deze methode dus niet. Ik heb haar bij mijn onderzoek dan ook niet toegepast, wat te minder noodig was, daar er eene andere methode bestaat om uit een mengsel van bacteriën de verschillende soorten afzonderlijk te verkrijgen, die het voordeel heeft nauwkeuriger en minder tijdroovend te zijn. Dit is de methode der vaste voedingsbodems, die door R. KOCH in de bacteriologische techniek is ingevoerd. Voordat ik deze methode bespreek, is het noodig met een enkel woord den term voedingsbodem, dien ik hierboven reeds eenige malen gebruikt heb, te verklaren.

Reeds spoedig nadat men de microben had leeren kennen, deed zich de wensch gevoelen om zoodanige voedingsvloeistoffen te hebben waarin zich de, bij eene bepaalde ziekte of bij eene gisting gevonden organismen even goed konden ontwikkelen, als in hunne natuurlijke omgeving, m.a.w. om deze zoo goed mogelijk na te bootsen.

Door na te gaan met welke stoffen de micro-organismen zich bij voorkeur voedden, kwamen de geleerden 1) die zich met hun onderzoek bezighielden, er toe, verschillende voedingsvloeistoffen te bereiden waaronder er enkele waren, die meer in het bijzonder voor gistzwammen, andere, die meer bepaald voor de kweeking van bacteriën dienden. Deze laatste noemde men normaalvloeistoffen voor bacteriën. Onder deze bleek vooral de zoogenaamde voedingsbouillon bijzonder goed bruikbaar te zijn, daar de meeste bacteriën zeer goed daarin groeiden. Deze bouillon wordt verkregen door fijn gehakt ossenvleesch in water te laten uittrekken, te kooken, te filtreeren, er dan een weinig pepton en keukenzout bij te voegen 2), en de vloeistof zwak alkalisch 3) te maken. Wanneer men te doen heeft met pathogene bacteriën, die meestal als reincultuur in het zieke lichaam voorkomen, bewijst deze voedingsbouillon uitstekende diensten om de bacteriën verder te kweeken en hunne eigenschappen te bestudeeren. Zoo men echter, hetzij een ziek lichaamsdeel, hetzij in

1) Dit zijn vooral PASTEUR, COHN, A. MAYER, NÄGELI geweest.

2) In plaats van vleesch, kan men zich ook van vleesch-extract bedienen. Ik gebruikte steeds bij het bereiden van mijne voedingsbodems LIEBIG's vleeschextract. Voor uitvoerige voorschriften ter bereiding van voedingsbodems raadplege men de handboeken over bacteriologie VAN HUEPPE, GÜNTHER e. a.

3) Verreweg de meeste bacteriën ontwikkelen zich niet bij zure reactie.

een te onderzoeken vloeistof, zooals in ons kolfje met tabak, een mengsel van bacteriën vermoedt, dan kost het veel moeite om met behulp van een voedingsvloeistof, de verschillende soorten van elkander te scheiden.

Het was voor de bacteriologie eene groote aanwinst, toen Robert Koch de methode der vaste voedingsbodems leerde toepassen. Deze bestaat in hoofdzaak daarin, dat men bij de voedingsvloeistof eene gelatineerende stof voegt, waardoor de eerste de eigenschap krijgt om bij zekere temperaturen vast, bij andere, hoogere temperaturen vloeibaar te zijn. Wanneer men een dergelijke voedingsbodem heeft bereid, en daarbij de noodige voorzorgen in acht heeft genomen, dat zoowel de voedingsstof zelve als het glas, waarin zij bewaard wordt, en de watteprop, waarmede dit is gesloten, volkomen kiemvrij zijn gemaakt, dan voegt men, nadat de voedingsbodem vloeibaar is gemaakt en weer tot dicht bij zijn stollingspunt is afgekoeld, een druppel van de vloeistof, wier bacteriën men wil onderzoeken, daarbij. Men schudt den nog vloeibaren voedingsbodem goed, zoodat de daarin gebrachte bacteriën er overal in verspreid geraken, en giet dan den inhoud van het glas uit op een gesteriliseerde plaat of in een schaaltje dat eveneens kiemvrij is gemaakt. De voedingsbodem stolt en elk der daarin aanwezige bacteriën wordt als het ware vastgelegd op de plaats waar zij zich bevindt onder het stollen. Op die plaats zal zij uit hare omgeving voedsel opnemen, groeien en zich vermenigvuldigen, wat eenvoudig geschiedt doordat zij zich in tweeën deelt, elk dezer deelen zich wederom in tweeën splitst enz. Het gevolg van deze voortgezette deeling zal zijn dat na eenigen tijd een met het bloote oog zichtbaar stipje zal verschijnen, dat niets anders is dan eene menigte bacteriën, die alle door deeling uit ééne bacterie ontstaan zijn. Men noemt dit eene kolonie van bacteriën. Daar nu het uitwendig voorkomen der kolonies voor bijna iedere bacteriesoort verschillend is, heeft men hierin een typisch kenmerk om te zien of er in een bepaalde vloeistof een of meer soorten voorkomen, en tevens om reincultures van die soorten te krijgen. Het belangrijke voordeel van de methode der vaste voedingsbodems tegenover die der vloeibare is gebleken „toen een Fransche en Duitsche commissie

wedijverend naar Egypte trokken om de cholera bacteriologisch te onderzoeken. De cholera-bacteriën leven in het darmkanaal niet in reine cultuur. De grondslag voor PASTEUR's methode ontbrak en de Fransche commissie keerde onverrichter zake terug. Daardoor was de triomf van ROBERT KOCH des te grooter wiens voedingsgelatine voor dit onderzoek als geknipt bleek" 1).

De meest gebruikte toevoegsels ter verkrijging van een vasten voedingsbodem zijn gelatine en agar-agar, beide in de kookkunst zeer bekende stoffen. Daar de eerste haar smeltpunt heeft tusschen 24° en 30°. is zij niet te gebruiken, wanneer men bacteriën wil kweeken, die bij hoogere temperaturen groeien. In de tropen, waar de temperatuur vaak boven 24° is, gebruikt men daarom meestal agar-agar, een plantaardig product, afkomstig van verschillende soorten zeewier, die op de Indische en Japansche kusten voorkomen. Het smeltpunt van agar-agar ligt bij ongeveer 90°, terwijl zij eenmaal gesmolten, eerst weer stolt bij ongeveer 30°. Deze eigenschap maakt haar zeer geschikt om een vasten voedingsbodem te helpen samenstellen en voor de kweeking van thermophile bacteriën gebruikt te worden.

Een groot voordeel van de vaste voedingsbodems die met gelatine en agar-agar zijn samengesteld, is hunne doorzichtigheid, waardoor de bacteriën, die zich in de schaaltjes, waarin de voedingsbodem is uitgegoten en gestold, ontwikkelen, gemakkelijk met zwakke vergrooting onder het mikroskoop bezichtigd kunnen worden. Deze eigenschap mist een andere vaste voedingsbodem, die ook veel in de bacteriologische laboratoria wordt gebruikt, met name de aardappel. Deze wordt, hetzij als schijfjes in schaaltjes liggend, hetzij als gehalveerde cylinders in buisjes, gebruikt, waarbij natuurlijk gezorgd moet worden dat alle levende kiemen vooraf gedood zijn.

Daar ook de kolonies van bacteriën op aardappel vaak zeer karakteristiek voor de soort zijn, wordt bij een bacteriologisch onderzoek steeds een aardappelcultuur gemaakt. Men doet dit echter wanneer men reeds op gelatine of agar-agar afzonderlijke kolonies heeft gekregen, en nu de eigenschappen van de aldus in reincultuur gekweekte bacteriën verder wil nagaan.

1) J. DE HAAN en M. STRAUB. Voordrachten over bacteriologie 1895.

Na deze opmerkingen over het gebruik van kunstmatige voedingsbodems in het algemeen, ga ik over tot de beschrijving van de door mij gebruikte, om de bacteriën, die in het kolfje aanwezig waren, nader te onderzoeken. Ik begon met de algemeen gebruikte zoogenaamde voedings-agar, die voor de meeste bacteriën een gunstigen voedingsbodem oplevert, en die aldus door mij werd bereid. Bij 500 gram 1) gedestilleerd water worden 5 gram LIEBIG's vleeschextract (1 pCt.) 5 gram pepton (1 pCt.) en 2½ gram keukenzout (½ pCt.) gevoegd, dit tezamen gekookt, en zwak alkalisch gemaakt met natriumcarbonaat.

Daarna wordt in deze bouillon 15 gram agar-agar (3 pCt.) opgelost 2), en nadat de temperatuur onder het stollingspunt van eiwit is gedaald, het wit van een ei, in 50 ccm. gedestilleerd water geklopt, toegevoegd om de vloeistof te klaren. In een glazen kolf, met watteprop gesloten, wordt alles goed dooreengeschud en vervolgens in den Papiniaanschen pot geplaatst. Na gedurende 45 minuten aan waterdamp onder een overdruk van 1 atmosfeer, te hebben bloot gestaan, wordt de vloeistof heet door filtreerpapier gefiltreerd, waardoor de geprecipiteerde eiwitstoffen en andere troebele producten achterblijven, en een heldere, lichtbruine vloeistof doorloopt. Dit is de in de bacteriologie kortweg genoemde voedings- of kweekagar. Deze wordt in reageerbuisjes gegoten, 5 à 10 ccm in elk buisje. Vooraf zijn deze buisjes met watteprop gesloten en gedurende een uur aan droge hitte van 180° blootgesteld. Daar er onder het vullen der buisjes nog infectie met vreemde kiemen kan plaats hebben, worden de buisjes met de voedingsagar nog eens gedurende een kwartier in den Papiniaanschen pot bij 115° gezet.

Een dezer buisjes werd vervolgens door mij gebruikt om met het bacteriën bevattende tabakswater uit het kolfje te enten. Daartoe liet ik het afkoelen 3) tot ongeveer 40° nam met een platinadraad,

1) Daar het de voorkeur verdient met zoo versch mogelijk bereide voedingsstoffen te werken, maakte ik telkens slechts geringe hoeveelheden.

2) Dit hooge percent-gehalte agar-agar gebruikte ik, om te voorkomen dat de voedingsbodem in de stoof van 50° zou gaan vervloeien, wat bij lager gehalte aan agar-agar gebeurt.

3) Buisjes, wier inhoud reeds gestold is, moeten in kokend water gezet worden, uit hoofde van het vroeger gezegde omtrent het smeltingspunt van agar-agar.

wiens uiteinde tot een lis is omgebogen, een druppel uit het kolfje 1) en bracht dien over in het buisje met voedingsagar. Nadat dit goed is geschud om de kiemen zoo gelijkmatig mogelijk in de agar te verdeelen, wordt deze laatste snel uitgegoten in een glazen schaaltje van ongeveer 9,5 cm. middellijn, en 1,5 cm. hoogte, met overslaand deksel. Dit schaaltje is in de bacteriologie bekend als „schaaltje van PETRI". Vooraf is het gesteriliseerd door gedurende een uur in de droogstoof bij 180° te staan. De voedings-agar bedekt als een dun, doorschijnend laagje den bodem van het schaaltje.

Ten einde de uitwendige omstandigheden, waaronder de bacteriën in een fermenteerenden stapel leven, na te bootsen, wordt het schaaltje nu, evenals het kolfje den vorigen dag, in de stoof gezet, wier inwendige temperatnur 50° bedraagt.

Om te voorkomen dat de voedings-agar ten gevolge der hooge temperatuur, uitdroogde en daardoor ongeschikt werd als voedingsbodem voor bacteriën te dienen, plaatste ik de schaaltjes van PETRI in een glazen doos met overgrijpend deksel. Op den bodem van de doos goot ik een weinig water; daarna zette ik de schaaltjes er omgekeerd in, zoodat het laagje gestolde agar naar boven kwam te liggen. Natuurlijk droeg ik zorg dat het water niet over den rand van het deksel van het onderste schaaltje kwam, hetgeen reeds min of meer werd verhinderd door den, naar boven gewelfden bodem van de glazen doos. Daar er in de door mij gebruikte glazen dozen slechts plaats is voor twee of drie schaaltjes, nam ik, wanneer ik er meer tegelijk in de stoof wilde zetten, mijn toevlucht tot een groot bekerglas, op welks bodem eveneens water werd geschonken. Om het onderste schaaltje niet in het water te laten staan, zette ik een leeg schaaltje onder in het glas. Op deze wijze kon ik twaalf schaaltjes van PETRI tegelijk in de stoof plaatsen. Door een omgebogen blikken plaat konden al de schaaltjes gemakkelijk uit het bekerglas gelicht worden. Een groot horlogeglas diende als afsluiting om de atmosfeer in het bekerglas vochtig te houden.

Daar ik mij, zooals gezegd, in de eerste plaats ten doel stelde,

1) De platinadraad moet in een gasvlam gegloeid worden om alle daarop aanwezige kiemen te dooden, en daarna afkoelen.

om bij gefermenteerde tabaksbladen de daarop voorkomende thermophile bacteriën te onderzoeken, behandelde ik een zeer groot aantal bladen, afkomstig van verschillende ondernemingen, op de boven vermelde wijze. Daar telkens slechts een gedeelte van het blad werd gebruikt, voorzag ik het overblijvende bladstuk van een nummer en bewaarde het in een flesch om later nog als contrôle te kunnen dienen.

De schaaltjes van Petri bleven gedurende ongeveer 24 uren in de stoof van 50°, daarop werden ze er uit genomen en bezichtigd. In de meeste gevallen was er een sterke ontwikkeling van bacteriën in de schaaltjes, wel een bewijs dus dat deze hooge temperatuur hunnen groei niet benadeelde. Van afzonderlijke kolonies was meestal niets meer te bemerken; de oppervlakte van de agar was geheel of gedeeltelijk met een laagje bedekt, tengevolge van den snellen groei der bacteriën, waardoor de oorspronkelijk op verschillende plaatsen opgekomen koloniën bij hunne uitbreiding met elkaar versmolten waren. Op sommige schaaltjes was de voedingsbodem met een dof laagje bedekt, aan zijn rand in vinger of polypvormige vertakkingen uitloopend, op andere schaaltjes vertoonden zich grootere of kleinere slijmachtige vlekken; deze drogen in het midden spoedig op krijgen daar een witte kleur en gaan plooien vormen, terwijl de rand glinsterend en slijmachtig blijft. Eindelijk waren er ook schaaltjes, waarop een menigte, kleine witachtige kolonies waren opgekomen. Steeds vond ik op mijn schaaltjes deze drie typen van kolonies terug. De aan de oppervlakte van de voedings-agar opgekomen kolonies schenen mij aanvankelijk derhalve tot drie verschillende soorten van bacteriën te behooren. Behalve deze oppervlakkig gelegen kolonies waren er echter in de diepere lagen van den voedingsbodem nog tal van kolonies ontwikkeld, die zich in alle schaaltjes, met het bloote oog gezien, als kleine, geelachtige stipjes voordeden. Daar er, voor het uitgieten van de nog vloeibare agar in de schaaltjes door schudden van de buisjes, voor gezorgd was, dat de kiemen zoo gelijk mogelijk door de geheele vloeistof verdeeld waren, en door het snelle stollen van de agar in de schaaltjes, de kiemen dadelijk vastgelegd werden, is het duidelijk dat zich overal in den voedingsbodem, en dus niet alleen aan de oppervlakte, kiemen zullen bevinden. De onder de

oppervlakte gelegen kiemen zijn in minder gunstige omstandigheden wat zuurstoftoevoer betreft. Voor sommige bacteriën, de zoogenaamde anaërobe, is evenwel juist afwezigheid van vrije zuurstof een voorwaarde voor hunne ontwikkeling. Deze zullen juist in de diepere lagen van een voedingsbodem zich sterk ontwikkelen. Uit de geringe ontwikkeling van de onder de oppervlakte gelegen kolonies in de schaaltjes, is reeds af te leiden dat deze ten minste niet streng anaërob zijn.

Bezichtigt men deze kleine kolonies met zeer zwakke vergrooting onder het mikroskoop, dan blijkt het dat zij in alle schaaltjes, ook waar de aan de oppervlakte gelegen kolonies verschillend zijn, hetzelfde voorkomen hebben. Zij doen zich voor als een vlechtwerk van haren of fijne worteltjes, in alle richtingen door elkaar gewonden. Daar het een gewoon verschijnsel is dat van een zelfde bacteriesoort, de kolonies op de oppervlakte van een vasten voedingsbodem, en die in de diepere lagen een geheel ander voorkomen hebben, moest nu nagegaan worden welken vorm die haarvormige kolonies zouden aannemen als zij zich op de oppervlakte van de agar konden ontwikkelen. Daartoe werd onder de noodige voorzorgen tegen infectie van buiten, met de punt van een platinanaald zulk een kolonie even aangestipt, en die naald vervolgens tegen den binnenwand van een buisje met gesmolten agar afgewreven, daarna het buisje geschud en uitgegoten in een schaaltje van Petri. Dit werd herhaaldelijk gedaan met de haarvormige kolonies uit drie schaaltjes, waarvan elk één der drie typen van de aan de oppervlakte gelegen kolonies bevatte. De nieuw aangelegde schaaltjes werden in de stoof van 50° gezet. Na 24 uren was ook hier rijkelijk ontwikkeling, zoowel op de oppervlakte als in de dieper gelegen lagen. De kolonies op de oppervlakte vertoonden weer de bekende drie vormen; die van de nieuw aangelegde schaaltjes beantwoorden evenwel niet altijd aan die van de oude, waarvan de haarvormige kolonie genomen was. De onder de oppervlakte gelegen kolonies hadden in al de nieuwe schaaltjes denzelfden vorm als in de oude.

Werd door dit verschijnsel reeds twijfel bij mij gewekt aan de meening dat ik met drie soorten van bacteriën te doen had, zoo gaf de volgende proef mij de zekerheid dat die meening onhoudbaar

was: Op dezelfde wijze als boven is medegedeeld van de haarvormige kolonies, legde ik ook van elk der typen van kolonies aan de oppervlakte nieuwe schaaltjes aan die eveneens bij 50° geplaatst werden. De kolonies op de nieuwe schaaltjes vertoonden weer dezelfde drie typen; het bleek echter dat elk der drie typen ook de beide andere vormen van kolonies kan doen ontstaan. Uit deze proeven blijkt dus dat zoowel de drie aan de oppervlakte gelegen vormen van kolonies als de haarvormige kolonies onder de oppervlakte alle een en dezelfde bacteriesoort vertegenwoordigen.

Daar alleen deze bacterie zich op de schaaltjes die bij 50° gezet werden, ontwikkelde, blijkt het dat er geen andere thermophile soort op de bladen voorkomt.

Het onderzoek van de uitgefermenteerde tabaksbladen van verschillende ondernemingen afkomstig, leverde dus dit resultaat dat op alle een bacterie voorkomt, die bij een temperatuur van 50° snel groeit.

In de tweede plaats moesten nu bladen uit verschillende stadiën der fermentatie afkomstig, op hun bacteriën onderzocht worden. Hierbij werd dezelfde methode gevolgd als boven voor de uitgefermenteerde bladen uitvoerig is uiteengezet. Nu legde ik echter van ieder kolfje twee schaaltjes van Petri aan, waarvan er een in de stoof bij 50°, en het andere bij kamertemperatuur geplaatst werd.

Op de schaaltjes, die bij 50° gestaan hadden, vond ik in de meeste gevallen weer dezelfde kolonievormen van vroeger terug. Dezelfde bacterie ontwikkelde zich ook, hoewel langzamer, op vele schaaltjes die bij kamertemperatuur gestaan hadden. Verscheiden malen echter kwam het voor dat op het schaaltje uit de stoof van 50° de bekende bacterie zich ontwikkelde, terwijl op het correspondeerende schaaltje, dat bij kamertemperatuur had gestaan, een andere bacteriesoort was opgekomen. Gemakshalve zal ik deze laatste bacterie B, en de bovengenoemde bacterie A noemen. Uit het onderzoek van een groot aantal bladen, die nog niet geheel uitgefermenteerd waren, vond ik dat op de meeste alleen bacterie A voorkomt, die zich bij 50° veel sneller ontwikkelt dan bij kamertemperatuur, dat op sommige bladen alleen bacterie B voorkomt, die zich bij kamertemperatuur beter ontwikkelt, en eindelijk dat

er ook bladeren zijn waar beide bacteriën voorkomen. De beschrijving en kenmerkende eigenschappen der beide bacteriën vindt men hierachter medegedeeld. Hier wil ik er op wijzen dat het een belangrijk feit is dat op bladen, die de fermentatie nog niet geheel doorgemaakt hebben, twee bacteriën worden aangetroffen, waarvan de eene zijn optimum van groei bij veel hooger temperatuur heeft dan de andere.

Daar ik bij mijn onderzoek van de bacteriën, die op uitgefermenteerde bladen voorkomen, alleen het oog gericht had op thermophile vormen, moest nu nagegaan worden of zich misschien ook onder gunstige omstandigheden op schaaltjes, met materiaal van die bladen aangelegd, bacterie B zou ontwikkelen. Daartoe legde ik opnieuw schaaltjes van Petri aan met materiaal van uitgefermenteerde bladen, en zette ik die nu niet bij 50°, maar bij kamertemperatuur. Op geen enkel schaaltje kreeg ik bacterie B. De mogelijkheid is daarom niet uitgesloten dat er misschien soms nog sporen van die bacterie op uitgefermenteerd blad voorkomen. Uit het constant voorkomen van bacterie A op uitgefermenteerde tabak en uit het veelvuldig voorkomen van diezelfde bacterie op tabak uit verschillende stadiën der fermentatie afkomstig, leid ik af dat die bacterie een werkzaam aandeel heeft bij de fermentatie, en vooral gedurende den loop van het fermentatieproces een belangrijke rol speelt. Ik acht het verder niet onwaarschijnlijk dat in het allereerste stadium der fermentatie, dus gedurende de voorfermentatie die de tabak meestal, nog aan stokjes geregen en op kleine stapels gezet in de droogschuren ondergaat, bacterie B hetzij alleen, hetzij met bacterie A, invloed heeft op de verandering, die het tabaksblad ondergaat. Deze meening steunt o. a. hierop, dat ik op tabak die nog niet gefermenteerd heeft, bacterie B ook aantrof. Het onderzoek van deze tabak, dat ik niet verder kan doorzetten, kan belangrijke aanwijzingen geven over de rol, die bacterie B bij de fermentatie speelt. Ik vond bacterie A op die tabak, doch veel minder constant dan op fermenteerende en uitgefermenteerde bladen, verder nog andere bacteriën, tot wier nader onderzoek de tijd mij ontbrak. Het is mogelijk dat ook deze nog eenig aandeel hebben aan de fermentatie, althans in het eerste stadium.

HOOFDSTUK IV.

INENTINGSPROEVEN MET REINCULTURES IN HET LABORATORIUM.

Laboratoriumproeven met de gevonden bacteriën B en A konden, ook al weer tengevolge van de plotselinge staking van dit onderzoek, niet in dien omvang genomen worden als wenschelijk was tot het verkrijgen van resultaten.

Vooreerst wilde ik onderzoeken of bacterie A een merkbare verandering te weeg bracht in tabaksbladen die na gesteriliseerd te zijn, vervolgens met een reincultuur van die bacteriën geënt werden. Daartoe werden eenige tabaksbladen, die nog slechts weinig gefermenteerd hadden langs de hoofdnerf gehalveerd, vervolgens de beide groepen bladhelften in kleinere stukjes geknipt, en elke groep in een schaaltje van PETRI gelegd. Op den bodem en tegen het deksel der schaaltjes was een stuk filtreerpapier gelegd. De beide schaaltjes werden in den autoclaaf gesteriliseerd door ze gedurende 45 minuten aan gespannen waterdamp van 120° bloot te stellen. Op dezelfde wijze werd dit met andere tabaksbladen gedaan, zoodat ik een zeker aantal schaaltjes van PETRI met in stukjes geknipte bladen kreeg, waarvan er telkens twee bij elkander behoorden. Zoo had ik derhalve twee groepen van schaaltjes, waarvan groep 1 de rechter — en groep 2 de linkschelften der bladen bevatten.

Van een versche bouillon-cultuur van bacterie A werd nu een weinig in een kolfje met gesteriliseerd water gebracht. Door middel van een in een fijne punt uitgetrokken glazen pipet, die in de vlam gesteriliseerd was, spoot ik een weinig van dit bacteriën bevattend water tusschen de bladstukjes van groep 2 der schaaltjes, terwijl de schaaltjes van groep 1 niet bespoten werden. Om nu den invloed na te kunnen gaan, dien de enting met bacterie A op

de tabak heeft, moeten alle andere omstandigheden, waaraan de tabak blootstaat gelijk zijn, en het eenige verschil bestaat hierin dat de eene groep schaaltjes met de bacterie geënt is, de andere niet.

Om de voorwaarden van een gistenden stapel tabak zooveel mogelijk na te bootsen, moet voor een hooge temperatuur en voor voldoende vochtige atmosfeer gezorgd worden. Dit kan aldus geschieden: de schaaltjes van Petri worden in groote glazen dozen geplaatst, waarvan de bodem en de deksel met filtreerpapier is belegd dat met gesteriliseerd water bevochtigd is.

De dozen worden nu in den thermostaat gezet, welks temperatuur op ± 50° wordt gehouden. Van tijd tot tijd moet het filtreerpapier in de dozen op nieuw bevochtigd worden.

Behalve op bovengenoemde wijze werden ook proeven genomen door van eenige bladen de eene helft te steriliseeren en de andere helft niet, zoodat de op het blad aanwezige microben niet vernietigd werden; verder was de behandeling als boven.

Ik laat hier de uitkomsten van eenige proeven volgen:

A. Eenige bladen weinig gefermenteerde tabak Deli-Tengahan, naoogst 1897 van de onderneming Oud—Djember werden gehalveerd, en in stukjes geknipt. De stukjes van de eene helft afkomstig kwamen in een schaaltje 1, die van de andere in een schaaltje 2. Beide schaaltjes met tabak werden gedurende 45 minuten in den autoclaaf bij 120° gesteriliseerd. 24 Juni 1898 werd de tabak in 2 met een versche bouiloncultuur van bacterie A, in gesteriliseerd water verdeeld, bespoten, en bij een vochtige atmosfeer in den thermostaat geplaatst waarin een temperatuur was van 47°.

De tabak in 1 werd niet met de bacterie geënt, en eveneens in de stoof bij een vochtige atmosfeer en bij 47° geplaatst. Dagelijks werden de glazen dozen, waarin 1 en 2 stonden, nagekeken en zoo noodig het filtreerpapier bevochtigd. 28 Augustus werden de schaaltjes uit den thermostaat genomen en bezichtigd. Er was geen verschil bemerkbaar tusschen de tabak in beide schaaltjes. Aan beide was de eigenaardige fermentatiegeur waar te nemen. Waarschijnlijk was de tabak in 1 niet steriel gebleven, daar gedurende de proef het schaaltje nu en dan even geopend was om te ruiken.

B. Weinig gefermenteerde tabak van de onderneming Djelboek

oogst 1897. De behandeling was dezelfde als bij A. De stukjes tabak kwamen in de schaaltjes 1a en 2a, die beide gesteriliseerd werden.

25 Juni 1898 werd 2a met een reincultuur van bacterie A geënt. Verder gelijk bij proef A.

28 Augustus nam ik de schaaltjes uit de stoof. Aan beide groepen van tabak was fermentatiegeur te bespeuren. Op de bladstukken in 2a was echter meer glans, terwijl vele stukjes van 1a een min of meer dof, rauw voorkomen hadden.

C. Weinig gefermenteerde tabak Deli-Tengahan, naoogst 1897 van de onderneming Oud-Djember.

De bladhelften werden niet in stukjes geknipt, maar gevouwen in de schaaltjes van Petri gelegd. De schaaltjes werden gesteriliseerd door ze gedurende 1 uur bij 120° in den autoclaaf te laten staan. Schaaltjes 1b en 2b.

25 Juni 1898 werd 2b met bacterie A geënt. Beide schaaltjes als boven in den thermostaat geplaatst.

28 Augustus. De tabak was te vochtig en met zwarte plekken voorzien. Fermentatie-geur aan beide groepen merkbaar.

D. Weinig gefermenteerde tabak Deli-Tengahan, naoogst 1897 onderneming Oud-Djember.

In stukjes geknipt, in schaaltjes 1c en 2c gelegd en gedurende 45 minuten in den autoclaaf bij 120° gesteriliseerd.

25 Juni 1898 entte ik 2c met bacterie A. Beide schaaltjes als boven in den thermostaat.

28 Augustus. Er was een gering verschil in geur en ook in glans tusschen beide groepen tabak.

E. Weinig gefermenteerde tabak, van de onderneming Soekawana, oogst 1897.

De tabak in stukjes geknipt, in schaaltjes 1d en 2d gelegd en gedurende 1 uur bij 120° in den autoclaaf gesteriliseerd.

5 Juli 1898. Schaaltjes 2d geënt met cultuur van bacterie A. Beide schaaltjes in den thermostaat als boven.

28 Augustus. Op de tabak van 2d ligt meer glans dan op die van 1d. Deze laatste ziet er rauwer uit. Aan 2d is de fermentatiegeur goed merkbaar; aan 1d is een andere geur.

F. Weinig gefermenteerde tabak Deli-Tengahan, naoogst 1897, van de onderneming Oud-Djember.

Bladhelften gevouwen in schaaltjes 1e en 2e. Beide 50 minuten in den autoclaaf bij 120°.

6 Juli 1898 Schaaltje 2e met bacterie A geënt. Met schaaltje 1e in den thermostaat.

28 Augustus. Op tabak van 2e is meer glans. Bij beide is geur; bij tabak van 2e iets sterker. Van deze proeven laten A en C geen gevolgtrekkingen toe over den invloed, die de inenting met bacterie A op de tabak heeft. Uit proef D blijkt dat de enting in elk geval eenigen invloed op de tabak heeft, terwijl B, E en F voor een gunstigen invloed pleiten. Vooral proef E is in dit opzicht duidelijk.

G. Weinig gefermenteerde tabak Deli-Tengahan, naoogst 1897, van de onderneming Oud-Djember.

In schaaltjes I en II tabak gelegd. 23 April 1898 beide gesteriliseerd en II geënt met bacterie A. Beide schaaltjes in thermostaat bij 47° en vochtige atmosfeer

5 Mei Tabak in II ruikt sterk naar zoet roggebrood.

H. Weinig gefermenteerde tabak Deli-Tengahan, naoogst 1897, van de onderneming Oud-Djember.

Tabak in schaaltjes I, II en III. Schaaltje I gesteriliseerd, II en III niet.

2 Mei. Alle 3 schaaltjes als boven in thermostaat.

5 Mei. Aan tabak in II en III is fermentatiegeur merkbaar, aan die in I niet.

I. Weinig gefermenteerde tabak Deli-Tengahan, naoogst 1897, van de onderneming Oud-Djember.

Tabak in 4 schaaltjes, waarvan I en II wel, III en IV niet gesteriliseerd worden.

7 Mei. Alle schaaltjes in den thermostaat geplaatst.

14 Mei. Aan tabak in I en II is geen fermentatiegeur, aan die in III en IV wel.

Hoewel deze laatste proeven nog met vele vermeerderd zouden moeten worden, om er onwederlegbare conclusies uit te mogen trekken, zoo versterken zij toch de meening dat de tabaksfermen-

tatie op de werking van bacteriën berust. Ik meen dan ook uit hetgeen mijn onderzoek tot dusverre aan het licht heeft gebracht, te mogen afleiden dat.

1°. De fermentatie der tabak geheel of ten deele het gevolg is van de stofwisseling van bacteriën.

2°. Een thermophile bacterie A, hierbij eene belangrijke rol speelt.

De tijd ontbrak om ook met bacterie B dergelijke proeven te nemen als met bacterie A, en eveneens om tabak, die nog in 't geheel niet gefermenteerd heeft, met beide bacteriën te enten. Alleen zij medegedeeld dat ik twee schaaltjes met correspondeerende bladhelften droge tabak steriliseerde, het eene met een cultuur van bacterie A. entte, het andere niet, en beide schaaltjes 24 Oct. 1898 in een glazen doos, als boven beschreven is, in den thermostaat bij 46° plaatste.

Aan de geënte tabak was 7 Dec. de fermentatiegeur waar te nemen, aan de niet geënte daarentegen niet.

HOOFDSTUK V.

INENTINGSPROEVEN OP DE ONDERNEMINGEN.

Op verzoek van de tabaksplanters in Djember nam ik met bacterie A eenige proeven in het groot op de ondernemingen zelve. Hoewel de uitkomst daarvan nog niet bekend is, zal ik eenigszins uitvoerig beschrijven, hoe ik daarbij te werk ging. De planters hebben hieraan dan een leiddraad om die proeven, als zij het wenschen, te kunnen voortzetten.

Van een, op de een of andere wijze verkregen reincultuur van bacterie A, maakte ik eenige agar-steekcultures. Deze verkrijgt men door op de hierboven beschreven wijze voedingsagar te maken, hiermede reageerbuisjes tot op de helft of een derde te vullen, buisjes en inhoud te steriliseeren en te laten afkoelen. Met een gesteriliseerde platinanaald raakt men vervolgens een reincultuur der bacterie even aan, en daarop steekt men die naald midden in de agarcylinder van het buisje. Op deze wijze kan men gemakkelijk reincultures van bacteriën met zich op reis medenemen, indien men slechts zorg draagt dat de hals van het buisje en de watteprop gesteriliseerd zijn. Verder nam ik eene groote menigte reageerbuisjes mede met in schuine richting gestolde voedingsagar. Deze dienen om zoogenaamde strijkcultures te maken. Het spreekt van zelf dat ook bij de bereiding van deze buisjes moet zorg gedragen worden dat alles goed gesteriliseerd is. Verzuimt men dit, dan kan het gebeuren dat men, denkende met een bepaalde bacterie in reincultuur te werken, in plaats daarvan een of meer vreemde bacteriën op zijn voedingsbodem heeft.

Behalve dit entings- en voedingsmateriaal heeft men nog noodig: eenige kleine kolfjes van Erlenmeyer, eenige kleine glazen trechters, filtreerpapier (om kleine filters, die in de trechters passen, te maken),

een platte platinanaald, eenige wijnflesschen, een spirituslampje, een petroleumkomfoor met blikken pan en eenige pulverisateurs, bestaande uit een glazen fleschje, een metalen buisje en een caoutchouc-buis met twee ballons. De kolfjes, trechters en pulverisateurs (behalve de caoutchoucbestanddeelen) worden een uur in kokend water gelegd, en daarna met kokend water gevuld; de wijnflesschen worden eveneens, na gereinigd te zijn, in een petroleumblik met water een uur lang aan kookhitte blootgesteld en met kokend water gevuld.

Ongeveer 24 uren voor de enting van een stapel tabak zal plaats hebben, make men eenige strijkcultures. Daartoe neemt men met de platte platinanaald, die eerst in de spiritusvlam is uitgegloeid, een weinig van het bacteriën-laagje dat zich in de agarsteekcultuur rond de opening van het steekkanaal ontwikkeld heeft, en strijkt nu met de naald over het schuine agarvlak. Om de ontwikkeling van de bacteriën te bespoedigen, brengt men de geënte buisjes in fermenteerende stapels waarvan de temperatuur 40° à 50° bedraagt. Dit kan zeer gemakkelijk geschieden door ze in de bamboe-kokers, waarin de thermometers gestoken worden, te leggen. Men moet zorg dragen dat het buisje niet geheel horizantaal maar iets hellend met de watterprop naar boven, komt te liggen, daar anders het condensatiewater dat onder in het buisje is, in aanraking met de prop komt en aanleiding tot infectie met schimmelsporen zou kunnen geven.

Na 24 uren hebben zich de bacteriën sterk ontwikkeld, en is de geheele oppervlakte van de agar met een witachtige laag bedekt. Met de platinanaald neemt men nu voorzichtig dit bacteriënlaagje van de agar af, en verdeelt het in een der kolfjes met uitgekookt en afgekoeld water, door de naald tegen den binnenwand van het kolfje af te wrijven. Het water in het kolfje krijgt nu een troebel, melkachtig voorkomen; bij het schudden ziet men klein wolkjes in de vloeistof. Daar er bij het afschrapen van het bacteriënlaagje licht stukjes agar mede komen, die later aanleiding zouden kunnen geven tot verstopping van het buisje in den pulverisateur, filtreert men het bacteriën-houdende water voor het te gebruiken.

Men zet een trechter met papieren filter op een wijnflesch, die met uitgekookt water is gevuld en giet den inhoud van het kolfje

daarin uit. De vloeistof wordt goed geschud en is nu tot gebruik gereed, zoodat het fleschje van den pulverisateur er mede gevuld kan worden. De tabak die men wil enten met een bepaalde bacteriesoort moet zoodanig met het bacteriën bevattende water bespoten worden dat zooveel mogelijk alle bladen van een bos bevochtigd worden. Het best zal dit geschieden wanneer de bossen onder het bespuiten flink geschud worden. Vooral moet zorg gedragen worden dat niet te veel vocht op het blad komt, daar dit zeer licht aanleiding kan geven tot een ongewenschte ontwikkeling van schimmel in den stapel. Bij mijne proeven op de ondernemingen Oud-Djember, Djelboek en Adjoeng gebruikte ik tabak, waarin weinig broei zat, die op stapels gezet, slechts langzaam in temperatuur toenam. Het zou mogelijk kunnen zijn dat door de enting met bacteriën de fermentatie in dergelijke tabak sneller zou verloopen. Als contrôleproef werd een stapel van dezelfde tabak met uitgekookt water ingespoten. Beide stapels waren dus geheel onder dezelfde omstandigheden wat vochtgehalte betreft.

Op een sneller verloop der fermentatie, aangewezen door een snellere rijzing van den thermometer, schijnt de inspuiting geen invloed te hebben gehad. Dit bewijst evenwel nog niets tegen een gunstigen invloed van de bacteriën op het eindproduct der fermentatie. Om dien zuiver na te kunnen gaan moeten de geënte bossen gemerkt worden, zoodat ze steeds herkenbaar blijven en aan het einde der fermentatie met de niet geënte bossen van dezelfde tabak kunnen vergeleken worden.

Als men bedenkt, hoeveel proeven, over een groot aantal jaren verdeeld, er noodig zijn geweest om de eigenschappen der verschillende soorten van bier- en wijngist te leeren kennen, hoe het er nog ver van af is dat men het laatste woord gesproken heeft over de werking der microben bij de boter- en kaasbereiding, waarvan de bacteriologische tijdschriften de laatste jaren uitvoerige studies bevatten, dan zal men begrijpen dat het al zeer onwaarschijnlijk, zoo niet onmogelijk zou zijn dat een onderzoek van een paar jaren dadelijk alle geheimen van de fermentatie der tabak aan het licht zou brengen.

HOOFDSTUK VI.

KENMERKEN EN EIGENSCHAPPEN VAN TWEE OP FERMENTEERENDE TABAK VOORKOMENDE BACTERIËN.

In het voorafgaande is alleen gesproken over het uitwendig voorkomen der bacteriën-kolonies op voedingsagar en over enkele physische voorwaarden voor hun groei. Op deze plaats zal een meer uitvoerige beschrijving van de bacteriën en van hunne ontwikkeling op verschillende voedingsbodems volgen. Dit laatste vooral is noodig om kenmerken te hebben, waaraan latere onderzoekers de bewuste bacteriën kunnen herkennen. Hoewel men ter onderscheiding van verschillende organismen, vooral er naar moet streven om kenmerken te hebben aan de morphologie en de ontwikkelingsgeschiedenis ontleend, is men bij de bacteriën tot nog toe vaak op biologische eigenschappen aangewezen, daar onze kennis van de morphologie en de ontwikkelingsgeschiedenis dier organismen nog zeer gering is. De biologische kenmerken bewijzen daarenboven vaak goede diensten om spoedig en vrij gemakkelijk een bepaalde bacterie te herkennen.

Eene beschrijving der voedingsbodems, die door mij gebruikt zijn, moge aan die der bacteriën en hunne eigenschappen voorafgaan.

Hierboven is reeds medegedeeld dat *voedingsagar* werd gebruikt. Behalve voor bacteriën-cultures in schaaltjes van Petri, komt de agar ook nog in aanmerking voor strijkcultures en voor steekcultures. De eerste verkrijgt men door een weinig van een bepaalde cultuur, langs de oppervlakte van in schuine richting gestolde agar in een reageerbuisje te strijken.

Als men een reageerbuisje ongeveer half met voedingsagar vult en deze laat stollen en dan een platinanaald met een weinig van een rein-

cultuur midden in den agarcylinder steekt, krijgt men een steekcultuur.

Een tweede algemeen gebruikte voedingsbodem is de zoogenaamde *voedings-* of *kweekgelatine*. Dit is de voedingsbodem par excellence voor koudere gewesten; in de tropen is hij minder bruikbaar wegens de betrekkelijk lage temperatuur, waarbij hij vloeibaar wordt. Na herhaalde vergeefsche proefnemingen, gelukte het mij op de volgende wijze een kweekgelatine te verkrijgen, die bij de gewone temperatuur in mijn laboratorium, 25° à 28°, vast bleef: 1 pCt. vleeschextract, 1 pCt pepton, $^1/_2$ pCt keukenzout worden in water opgelost, gekookt, zwak alkalisch gemaakt en bij 120° in den autoclaaf gedurende 45 minuten gesteriliseerd. In de nog warme vloeistof wordt 15 pCt gelatine opgelost, zoo snel mogelijk gefiltreerd en de gefitreerde vloeistof in reageerbuisjes gegoten, die al naar dat men schaaltjes van Petri wil aanleggen, strijkcultures of steekcultures wil maken, meer of minder gevuld moeten worden. De buisjes met de kweekgelatine komen nu nog gedurende 15 minuten in den autoclaaf bij 115°. Langdurige verhitting doet de gelatine de eigenschap om vast te worden, verliezen.

Behalve als vastmakend middel, doet de gelatine ook dienst als voedsel voor bacteriën. Door sommige bacteriën wordt n. l. het eiwit van de gelatine in pepton omgezet, waardoor de gelatine vervloeit. Dit is een zeer karakteristieke eigenschap van vele bacteriën.

Naast deze beide doorzichtige vaste voedingsbodems wordt in de bacteriologie veel gebruik gemaakt van den *aardappel*, en wel op de volgende wijze:

Na goed mechanisch gereinigd te zijn, worden de aardappelen in sublimaatoplossing (0,1 pCt) gelegd, in gesteriliseerd water afgespoeld en geschild. Met een uitgegloeid mes worden zij vervolgens in schijfjes van ongeveer 1 c. M. dikte gesneden. Van deze worden er telkens twee in een gesteriliseerd schaaltje van Petri gelegd. De schaaltjes met de aardappelschijfjes worden gedurende twee dagen telkens één uur aan stroomenden waterdamp in Koch's apparaat blootgesteld.

Eene grondige sterilisatie is vooral hier noodig, daar op den aardappel sporen voorkomen van bacteriën, die een bijzonder grooten weerstand hebben.

Met een, aan haar uiteinde afgeplatte platinanaald, neemt men een weinig van een der kolonies en strijkt dit op de oppervlakte van een der aardappelschijfjes, die in een schaaltje van Petri liggen. Het andere schijfje diende mij ter contrôle; dit werd namelijk niet met de platinanaald bestreken, en moest dus, wanneer de sterilisatie volkomen was geweest, rein blijven.

Eene andere methode om den aardappel als voedingsbodem te gebruiken, is hem in den vorm van halve cylinders in reageerbuisjes te doen die met een watteprop gesloten zijn.

Nadat hij goed is gereinigd en vervolgens geschild, worden er met een kurkboor, wier middellijn iets kleiner is dan die van het reageerbuisje, cylinders uitgestoken. Deze worden in schuinsche richting doorgesneden, zoodat men twee wigvormige lichamen verkrijgt, elk begrensd door een grondvlak van den cylinder, zijn halven mantel, en het door de snede ontstane vlak. Met het grondvlak naar onder brengt men die halve cylinders in reageerbuisjes, welke dicht bij hun bodem eene kleine vernauwing hebben. Deze dient om het aardappelstukje tegen te houden, en te verhinderen dat het in aanraking komt met het condensatiewater, hetwelk gedurende het steriliseeren ontstaat, en dat zich in het onderste gedeelte van het buisje verzamelt. Nadat de buisjes met de aardappelstukjes zijn gesteriliseerd, wordt de schuine vlakte met een weinig van de kolonie geënt.

Het voordeel van deze methode is, dat er minder gevaar bestaat voor verontreiniging door kiemen uit de lucht bij het openen der reageerbuisjes, dan bij het openen der schaaltjes.

De meest gebruikte vloeistof om bacteriën te kweeken is de *voedingsbouillon*, die aldus bereid wordt:

1 pCt. Liebig's vleeschextract, 1 pCt. pepton, ½ pCt. keukenzout worden in water opgelost, gekookt, zwak alkalisch gemaakt, gefiltreerd en gesteriliseerd. Daarna worden reageerbuisjes voor de helft of twee derde met de vloeistof gevuld en nogmaals gesteriliseerd.

Verder gebruikte ik nog *tabaksextract*, verkregen door ongefermenteerd tabaksblad bij 50° gedurende 24 uren in water te laten uittrekken, daarna te filtreeren, te steriliseeren en in buisjes te gieten.

Met dit tabaksextract maakte ik ook vaste voedingsbodems, door de kweekagar en gelatine hiermede te bereiden.

Ik kreeg met het op deze wijze bereid tabaksextract betere resultaten, dan met het tabaksdecoct in mijn rapport, pg. 24, vermeld. Dit laatste was bovendien afkomstig van bladen, die in de droogschuur reeds een voorfermentatie hadden doorgemaakt.

Wil men niet alleen de kolonies der bacteriën zien maar ook met hen zelven kennismaken, dan moet men van een sterke vergrooting gebruik maken. Men brengt een weinig van een kolonie uit een reincultuur in een druppel gesteriliseerd water op een goed gereinigd, zeer dun dekglas. Dit laatste legt men vervolgens, met den druppel naar onderen, op een met een glazen ring voorzien voorwerpglas. De druppel hangt dus in een kleine, met vochtige lucht gevulde ruimte, gevormd door voorwerpglas, dekglas en glazen ring. Dit toestelletje brengt men op de tafel van het mikroskoop. Eene goede afbeelding van zulk eene vochtige kamer vindt men in No. 27 van deze Mededeelingen, 1) waar tevens nuttige raadgevingen over het gebruik van het mikroskoop zijn gegeven.

Wanneer men een *agar-schaaltje* met een reincultuur van *Bacterie A* aanlegt, en men zorgt dat er niet te veel kiemen in aanwezig zijn, ziet men nadat het schaaltje gedurende twee dagen bij kamertemperatuur gestaan heeft, kleine witachtige kolonies op de oppervlakte. Deze zijn meest allen van polypvormige uitloopers voorzien, die zich nog weer vertakken (Fig. 1). Het voorkomen doet eenigszins aan gestold vet denken. Spoedig beginnen zich op die kolonies plooien te vormen, terwijl zij in omvang toenemen en er nog meer vertakkingen aan de uitloopers optreden. In de diepere lagen ziet men kleine geelachtige kolonies (de kleine stipjes op de teekening), die zich door gebrek aan zuurstof niet verder ontwikkelen. Eindelijk vindt men op den bodem van het schaaltje grijze vlekken, ontstaan door de ontwikkeling van eene menigte kiemen, die bij het uitgieten van de agar op den bodem zijn gezonken.

Een *agarstrijkcultuur* bij kamertemperatuur geplaatst doet na 1 dag nog slechts eene geringe ontwikkeling zien: eene uiterst dunne, min of meer slijmachtige streep. Na 2 dagen is er op de agar een droge, witachtige streep. In 't midden er van vertoonen

1) A. Zimmermann. De Nematoden der koffiewortels, 1898, pg. 11.

zich rimpels en plooien, terwijl aan den rand knopvormige uitwassen met een vetglans zijn. Bij andere cultures treedt dit vettig uiterlijk over de geheele streep meer op den voorgrond. Een gering verschil in reactie van den voedingsbodem schijnt invloed op de plooivorming te hebben. Zwak zure reactie gaf meer plooien en rimpels (Fig. 2).

Bij een *agarsteekcultuur* ontwikkelt zich rond de opening van het steekkanaal een droog, witachtig laagje, min of meer geplooid. Het breidt zich langzamerhand over de geheele oppervlakte uit, en krijgt bij oudere cultures een vetachtig voorkomen. In het steekkanaal stralen naar alle zijden fijne, wortelvormige uitloopers uit (Fig. 3, 4 en 5).

Op een *gelatineschaaltje* ontstaan kleine ronde kolonies, die zich langzaam uitbreiden. Zij vormen eindelijk elk een sterk geplooid vlies, waaronder de gelatine vervloeit, en dat dus als 't ware drijft op de kringvormig vervloeide gelatine.

Bij een *gelatinestrijkcultuur* ontstaat een goot door langzame vervloeiing der gelatine, terwijl het vlies dat zich daarop ontwikkelt, naar beneden in den bodem van het buisje glijdt.

Gelatinesteekcultuur. Op den tweeden dag is er rond de opening van het kanaal een gerimpeld laagje ontstaan, dat trechtervormig is ingezonken (Fig. 7). Daaronder is eene komvormige vervloeiing van de gelatine begonnen (Fig. 6). Na eenige dagen is er een sterk geplooid, dik vlies, terwijl de vervloeiing langzaam over de geheele oppervlakte gelijkmatig voortschrijdt. In het kanaal is bijna geen ontwikkeling. De vervloeide gelatine blijft vrij helder.

Aardappelcultuur. Deze kan een zeer verschillend voorkomen hebben, hetgeen van den aardappel afhangt. Aanvankelijk meende ik dat er eene verontreiniging van mijne cultures had plaats gehad toen ik na van Bacterie A eenige aardappelcultures te hebben aangelegd, kolonies kreeg die er op den eenen aardappel geheel anders uitzagen dan op den anderen. Toen ik daarop van dezelfde reincultuur van Bacterie A schijfjes en cylinders van verschillende aardappels entte, bleek dat steeds op de stukjes, die van een zelfden aardappel afkomstig waren, ook een gelijksoortige cultuur opkwam, maar dat dezelfde reincultuur op een anderen aardappel

soms een cultuur van een geheel verschillend voorkomen deed ontstaan.

Zoo krijgt men twee vormen, waaronder de aardappelcultuur van Bacterie A zich voordoet. Bij den eenen ontstaat een slijmachtig laagje van vuil-geelgroene tint, waarop hier en daar kleine blaasjes liggen (Fig. 8). De aardappel zelf neemt een blauwachtige tint aan. Bij den anderen ontwikkelt zich op den aardappel een grijswit, droog, korstachtig laagje, terwijl de aardappel donker wordt (Fig. 9).

Bouilloncultuur. Op den tweeden dag ziet men kleine blaasjes op de oppervlakte der vloeistof. Na nog eenige dagen is er een vrij dik, wit vlies met sterke plooien. De vloeistof onder het vlies is helder. Bij andere cultures laten er vlokken uit het vlies los en zinken op den bodem, waardoor de bouillon min of meer troebel wordt.

Bij een cultuur in *tabaksextract* ontwikkelt zich na eenige dagen een korrelig vliesje op de oppervlakte, terwijl de vloeistof helder blijft.

Culturen op agar met tabaksextract hebben hetzelfde voorkomen als die op gewone agar.

Eenige physische en chemische eigenschappen. De rijkelijke ontwikkeling op de oppervlakte der verschillende voedingsbodems, terwijl de groei in de diepere lagen zeer spaarzaam is, wijst er op dat wij hier met een aerobe bacterie hebben te doen. A priori mag men trouwens reeds verwachten dat een bacterie, die bij de tabaksfermentatie eene rol vervult, de zuurstof der lucht noodig heeft, daar de ervaring geleerd heeft, dat bij een stapel fermenteerende tabak, waarin de broei heeft opgehouden, overzetten van den stapel en flink schudden der bossen, d. i. dus nieuwe toevoer van zuurstof, gunstig werkt.

Groei heeft plaats bij temperaturen van 25°—58° 1). Het optimum ligt tusschen 44° en 50°. Bij een temperatuur van 51°—54° is er nog vrij sterke ontwikkeling. Boven 59° heeft er geen groei meer plaats.

In de schaaltjes is een ammoniaklucht merkbaar; een rood

---

1) Hiermede is natuurlijk niet gezegd dat er onder 25°, de gemiddelde laboratorium temperatuur, geen ontwikkeling plaats heeft. Dit heeft echter geen praktisch belang, daar dergelijke temperaturen in een fermenteerschuur op Java nooit voorkomen.

lakmoespapier tegen den binnenwand van den deksel gelegd, wordt blauw gekleurd.

De vervloeiing der gelatine wijst op omzetting der eiwitlichamen in peptonen door de bacteriën.

Mikroskopisch voorkomen. In een jonge cultuur vindt men kleine staafjes, 1,75 à 2,5 μ lang, en $\pm$ 0,5 μ dik. Aan de beide polen zijn zij eenigszins convex Zij bewegen zich met groote snelheid. Vaak zijn zij twee aan twee met elkaar verbonden. In andere cultures, waar vliesvorming is opgetreden vindt men de bacteriën tot zeer lange draden vereenigd, wier opbouw uit afzonderlijke staafjes vaak alleen met kleurstoffen is aan te toonen.

In oude culturen, waarin de voedingsstoffen zijn opgebruikt, vormen zich endosporen. Deze ontstaan in het midden der staafjes, zijn ellipsoïdisch en hebben een grootte van $\pm$ 1,5 μ. Bij de kieming vermindert de glans en zwelt de spoor op zoodat zij min of meer rond wordt. Aan de beide polen zijn donkere omtrekken, die scherp tegen het heldere middelste gedeelte afsteken. Loodrecht op de lengterichting der spoor ontstaat een kleine uitstulping, die in lengte toeneemt. De kiemende spoor krijgt nu het voorkomen van een mikroskopische paddestoel. Spoedig wordt het pas ontkiemde staafje duidelijk zichtbaar; het gaat zich bewegen en deelt zich in tweeën. De ledige sporenhuid blijft vaak nog eenigen tijd aan het zich snel voortbewegende dubbelstaafje vastzitten.

Wat de systematische plaats van Bacterie A betreft, zoo behoort hij, volgens het systeem van MIGULA, 1) in de familie der *Bacteriaceae* en tot het geslacht *Bacillus*. Hij is verwant met B. subtilis. Voorloopig kan hij *Bacillus tabaci-fermentationis* genoemd werden.

Een *agarschaaltje* met een reincultuur van *Bacterie B* aangelegd, doet reeds na 24 uur op de oppervlakte een menigte, glanzende, glasheldere kolonies zien. Reeds den tweeden dag gelijken deze op druppels room (Fig. 10). Zij nemen in grootte toe, maar vertoonen niet de eigenaardige vertakkingen van Bacterie A. Soms treden plooien op de gewelfde oppervlakte der kolonies op, die echter laten weer verdwijnen. Onder de oppervlakte zijn

1) W. MIGULA. System der Bakteriën. 1897.

een menigte zeer kleine kolonies, die zich niet verder ontwikkelen.

Bij een *agarstrijkcultuur* is er reeds na 1 dag op de oppervlakte een glanzend, witte streep ontstaan, die spoedig een geelwitte, roomachtige dikke laag wordt (Fig. 11). Geen plooien op de cultuur. De rand is gekarteld.

Agarsteekcultuur. Na 1 dag heeft zich rond de opening van het steekkanaal een roomachtig laagje ontwikkeld, waarop men concentrische kringen en plooien ziet, die later verdwijnen (Fig. 12 en 13). Dan is nagenoeg de geheele oppervlakte met een geelachtig laagje bedekt, waarvan de rand gekarteld is en in franjes uitloopt. In het steekkanaal is slechts geringe ontwikkeling; in het bovenste gedeelte van het kanaal ziet men franje-achtige uitloopers.

Op een *gelatineschaaltje* ontstaan glanzende kolonies, waaronder de gelatine spoedig vervloeit.

Ook bij een *gelatinestrijkcultuur* heeft spoedig vervloeiing plaats in de goot die zich onder de witachtige streep vormt. Na eenige dagen ziet men slechts vloeibare, troebele gelatine in het onderste gedeelte van het buisje.

Gelatinesteekcultuur. Rond de kanaalopening ontwikkelt zich een glinsterend wit laagje, waaronder eene komvormige inzakking reeds de vervloeiing der gelatine aanduidt (Fig. 14 en 15). In het kanaal is uiterst geringe ontwikkeling. Na eenige dagen is er op de oppervlakte een dik wit vlies, dat drijft op de vervloeide gelatine. De vervloeiing heeft gelijkmatig plaats en gaat vrij snel. De vervloeide gelatine is troebel.

Aardappelcultuur. Na 24 uur is er een glinsterende, slijmachtige streep ontstaan, den daarop volgenden dag is er een geelachtig, geplooid vlies, eerst met vettig voorkomen, later droog. Bij andere culturen wordt het min of meer slijmachtig. De aardappel wordt blauwachtig gekleurd (Fig. 16).

Bouilloncultuur. Reeds na 24 uur is de bouillon troebel. Wordt het buisje geschud, dan ziet men lichte wolkjes. Na een paar dagen begint zich een vlies te vormen op de oppervlakte. Dit is roomachtig wit, zonder plooien. De bouillon onder het vlies is troebel, meer naar onder is zij helder.

Bij een cultuur in *tabaksextract* ziet men een lichte troebelheid van de vloeistof.

Op *tabaksextract-agar* krijgt men kolonies, die roomkleur en glans hebben, overeenkomend met die op gewone agar.

Eenige physische en chemische eigenschappen. Ook *Bacterie B* is aëroob.

Hij groeit het best bij de gewone laboratorium temperatuur. Goede ontwikkeling heeft nog plaats tot een temperatuur van 50°. Bij 51° en 52° is er nog geringe groei, bij 53° niet meer.

Ook *Bacterie B* doet ammoniak ontstaan, en zet de eiwitstoffen in peptonen om, sneller dan Bacterie A.

Mikroskopisch voorkomen. In een versche cultuur vindt men staafjes, die, 1,5 à 2,5 μ lang, en $\pm$ 0, 45 μ dik zijn. Zij zijn iets slanker dan de staafjes van Bacterie A.

De beide polen zijn convex. Eigen beweging der staafjes heb ik nooit waargenomen. Ook hier, vooral bij jonge cultures, ziet men vaak dubbelstaafjes. Bij oudere cultures blijven de staafjes, na deeling, tot lange draden verbonden. In het midden van de staafjes ontstaan endosporen, zonder dat er eene aanzwelling bij optreedt. De sporen zijn $\pm$ 1,5 μ lang, en staafvormig. Bij de kieming verliezen zij hun glans en zwellen een weinig. Zonder merkbare veranderingen ontwikkelt zich verder de bacterie uit de spoor, wier wand waarschijnlijk opgelost wordt. Lengte-as van spoor en staafje is dezelfde.

Evenals de hierboven beschreven bacterie behoort ook deze tot de familie der *Bacteriaceae*, maar tot het geslacht *Bacterium*. Voorloopig zij hij *Bacterium tabaci-fermentationis* genoemd.

NASCHRIFT.

Terwijl mijn manuscript voor den druk gereed lag en ik op het punt stond naar Europa te vertrekken, kwam mij in handen het opstel van O. Loew: Curing and Fermentation of cigarleaf Tobacco. U. S. Department of Agriculture Report 59, Washington 1899.

Loew beweert dat de voornaamste veranderingen gedurende het drogen en fermenteeren van de tabak door enzymen worden veroorzaakt, en bij het fermentatie-proces een oxydase en een peroxydase (leptomine van Raciborski) optreden.

Hieromtrent wil ik alleen dit mededeelen, dat reeds het vorig jaar Dr. Raciborski mijn aandacht er op vestigde of wellicht bij de fermentatie der tabak oxydase en leptomine een rol speelden. Een onderzoek op gedroogde tabak, dat Raciborski de goedheid had voor mij te doen, toonde geen oxydase en leptomine aan. Gedurende het drogingsproces verdwijnen deze oxydeerende lichamen, en spelen dus, althans op Java, geen rol meer bij de fermentatie.

VERKLARING DER PLATEN.

PLAAT I.

Alle figuren van Bacillus tabaci-fermentationis.

Fig. 1. Kolonies op voedingsagar in schaaltjes van Petri. Cultuur van 3 dagen bij kamertemperatuur. De witte kolonies liggen op de oppervlakte, de grijze in diepere lagen.
Fig. 2. Agarstrijkcultuur; 2 dagen oud, bij 32°.
Fig. 3. Agarsteekcultuur; 2 dagen oud, bij kamertemperatuur.
Fig. 4. Agarsteekcultuur; 4 dagen oud, bij kamertemperatuur.
Fig. 5. Laagje op de oppervlakte van de agarsteekcultuur van fig. 4, van boven gezien.
Fig. 6. Gelatinesteekcultuur; 3 dagen oud.
Fig. 7. Oppervlakte van cultuur van fig. 6, van boven gezien.
Fig. 8. Aardappelcultuur; 3 dagen oud, bij kamertemperatuur.

PLAAT II.

Fig. 9 van Bacillus tabaci-fermentationis. De overige figuren van Bacterium tabaci-fermentationis.

Fig. 9. Aardappelcultuur; 3 dagen oud, bij kamertemperatuur.
Fig. 10. Kolonies op voedingsagar in schaaltjes van Petri. Cultuur van 2 dagen bij kamertemperatuur.
Fig. 11. Agarstrijkcultuur; 2 dagen oud, bij kamertemperatuur.
Fig. 12. Agarsteekcultuur; 2 dagen oud, bij kamertemperatuur.
Fig. 13. Oppervlakte van cultuur van fig. 12; 3 dagen oud.
Fig. 14. Gelatinesteekcultuur; 3 dagen oud.
Fig. 15. Oppervlakte van cultuur van fig. 14.
Fig. 16. Aardappelcultuur; 2 dagen oud, bij kamertemperatuur.

1.

2.

3.

4.

5.

7.

8.

6.

Kaden Soedirman, del.

Lith. van Mulder, Leiden.

10.

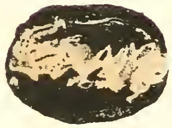
11.

12.

13.

14.

15.



9.

16.

Raden Soedirman, del.

Lith. van Mulder, Leiden.

ERRATA.

INHOUD staat *f* 1.— lees blz. 1.

Blz.	8	regel	16	v. b.	staat: Tesca 3) lees: Tesca 4).
„	11	„	1	v. b.	moet ving wegvallen
„	17	„	16	v. b.	staat: glasplaat 2) lees: glasplaat 1).
„	18	„	17	v. o.	staat: atmosfeor lees: atmosfeer.
„	20	„	14	v. b.	staat: Iliduze lees: Ilidze.
„	20	„	3	v. o.	staat: Hijgien lees: Hygien.
„	22	„	3	v. b.	staat: bacteriënsoort lees: bacteriesoort.
„	23	„	7	v. o.	staat: hetzij een lees: hetzij in een.
„	27	„	16	v. b.	staat: PETBY lees: PETRY.
„	32	„	8	v. o.	staat: linkschelften lees: linker helften.
„	33	„	2	v. b.	staat: bestaat hierin lees: hierin bestaan.
„	34	„	5	v. o.	staat: schaaltjes lees: schaaltje.
„	35	„	8	v. b.	moet nieuwe regel beginnen met: Van deze proeven.
„	37	„	14	v. o.	staat: in de lees: in den.
„	38	„	17	v. o.	staat: horizantaal lees: horizontaal.
„	45	„	13	v. b	staat: andere lees: oudere.
„	46	„	9	v. b.	staat: andere lees: oudere.
„	47	„	8	v. o.	staat: andere lees: oudere.

MEDEDEELINGEN UIT 'S LANDS PLANTENTUIN.

Van deze belangrijke serie verscheen het volgende:

No.			
No. 1.	Dr. W. Burck, Rapport omtrent een onderzoek naar de Getah-pertja produceerende boomsoorten in de Padangsche Bovenlanden. Bat. 1884	*f*	1.—
„ 2.	Dr. M. Treub, Onderzoekingen over sereh-ziek suikerriet gedaan in 's Lands Plantentuin te Buitenzorg Batavia, 1885. . . .	„	0.75
„ 6.	Dr. M. Treub, Geschiedenis van 's Lands Plantentuin te Buitenzorg *Eerste gedeelte*. Bat. 1889	„	1.25
„ 7.	M. Greshoff, Eerste verslag van het onderzoek naar de plantenstoffen van Nederlandsch-Indië 1890.	„	3.—
„ 8.	Dr. J. M. Janse, Proeve eener verklaring van sereh-verschijnselen. Bat. 1891	„	0.70
„ 9.	Dr. J. M. Janse, Het voorkomen van bacterien in suikerriet Bat. 1891. Met 1 plaat.	„	0.75
„ 10.	M. Greshoff, Beschrijving der giftige en bedwelmende planten bij de vischvangst in gebruik. Bat. 1893	„	2.—
„ 11.	Dr. S. H. Koorders en Th. Valeton, Bijdrage No. 1 tot de kennis der boomsoorten van Java. Bat. 1894	„	4.—
„ 12.	Dr S. H. Koorders, Plantkundig woordenboek voor de boomen van Java. Met korte aanteekeningen over de bruikbaarheid van het hout. Bat. 1894	„	2.—
„ 13.	Dr. W. G. Boorsma, Eerste resultaten van het door hem verrichte onderzoek naar de plantenstoffen van Nederl Indië. Bat. 1894. .	„	1.50
„ 14.	Dr. S. H. Koorders en Dr. Th. Valeton. Bijdrage No. 2 tot de kennis der boomsoorten van Java. Bat. 1895	„	2.50
„ 15.	Dr. J. van Breda de Haan, De bibitziekte in de Deli-Tabak veroorzaakt door phytophthora nicotianae. Bat. 1896. Met plaat. .	„	1.50
„ 16.	Dr. S. H. Koorders en Dr. Th. Valeton, Bijdrage No. 3 tot de kennis der boomsoorten van Java Bat. 1896	„	2.50
„ 17.	Dr. S. H. Koorders en Dr. Th. Valeton, Bijdrage No. 4 tot de kennis der boomsoorten van Java Bat. 1896	„	2.50
„ 18.	Dr. W. G Boorsma, Nadere resultaten van het door hem verrichte onderzoek naar de planten van Nederl. Indië Bat. 1897. . . .	„	1.50
„ 19.	Dr. S. H. Koorders, Verslag eener botanische dienstreis door de Minahasa, tevens eerste overzicht der Flora van N. O. Celebes, uit een wetenschappelijk en praktisch oogpunt. Met 10 kaarten en 3 platen.	„	15.—
„ 20.	Dr. J. C. Koningsberger, De dierlijke vijanden der koffiecultuur op Java. Deel I. Bat. 1897. Met 6 platen	„	2.50
„ 21.	Dr. A. v. Bijlert, Onderzoek van eenige grondsoorten in Deli. Bat. 1897.		1.25
„ 22.	Dr. J. C. Koningsberger, Eerste overzicht der schadelijke en nuttige insecten van Java. Bat. 1898.	„	1.25
„ 23.	Dr. J. van Breda de Haan, Regenval en reboisatie in Deli Bat. 1898	„	2.—
„ 24.	Dr. J. G. Kramers, Waarnemingen en beschouwingen naar aanleiding van eene reis in de koffie. Batavia, 1898.	„	2.—
„ 25.	M. Greshoff, Tweede vervolg van het onderzoek naar de plantenstoffen van Nederlandsch-Indië.	„	2.—
„ 26.	Dr. A. van Bijlert, Onderzoek van eenige grondsoorten in Deli (Vervolg van No. 21). 1898	„	2.50
„ 27.	Prof. Dr. A. Zimmermann, De Nematoden der koffiewortels . .	„	2.—
„ 28.	Dr. J. M. Janse, De nootmuscaat-cultuur in de Minahassa en op de Banda-eilanden. Met 4 platen.	„	1.50
„ 29.	M. Greshoff. Tweede Gedeelte van de Beschrijving der Giftige en bedwelmende Planten bij de Vischvangst in gebruik, tevens overzicht der heroïsche gewassen der geheele aarde en hunner verspreiding in de natuurlijke planten familiën. [Monographia de plantis venenatis et sopientibus quae ad pisces capiendos adhiberi solent; Pars II.] *Ter perse.*		
„ 30.	Dr. A van Bijlert. Onderzoek van Deli-Tabak.	„	2.—
„ 31.	Dr. W. G. Boorsma. Nadere Resultaten van het door hem verrichte onderzoek naar de plantstoffen van Ned Indië (III). . .		
„ 32.	Dr. J. G. Kramers. Verslag omtrent de proeftuinen in andere mededeelingen over koffie.		

☞ **Te bekomen voorzoover niet uitverkocht bij**

Nos. 3, 4, 5, 24, zijn uitverkocht.

G. KOLFF & Co.

Batavia en Weltevreden.